

Université de Montréal

Faculté des études supérieures et postdoctorales

Développement d'outils analytiques pour évaluer la
biodisponibilité du Cd dans les eaux douces

Par
Roxane England

Département de chimie, Université de Montréal
Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des arts et des sciences
en vue de l'obtention du grade de maître
en chimie

Août, 2009

© Roxane England, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :
Développement d'outils analytiques pour évaluer la
biodisponibilité du Cd dans les eaux douces

présentée par :
Roxane England

a été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes :

Sébastien Sauvé
Président-rapporteur

Kevin J. Wilkinson
Directeur de recherche

Marius D'Amboise
Membre du jury

Résumé

Les phytochélatines (PC) sont des polypeptides ayant la structure générale, $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{Gly}$, où $n = 2$ à 11. Leur synthèse est induite par un grand nombre de végétaux en réponse à une élévation de la concentration du milieu en métaux, en particulier le cadmium (ci-après, Cd). Le but de cette étude a été de développer un outil pour évaluer la biodisponibilité du Cd dans les eaux douces. Pour ce faire, une méthode analytique a été réalisée afin de déterminer les phytochélatines induites dans les algues *C. reinhardtii*. Celle-ci consiste à utiliser la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LCHP-SM/SM) "on-line". L'ionisation des molécules est celle faite par électroébulisaison (IEN) (traduction de *electrospray ionisation*). L'objectif principal de ce mémoire est la validation de cette méthode : la détermination des courbes de calibration et des limites de détection et l'identification d'interférences potentielles.

L'utilisation de dithiothreitol (DTT) à une concentration de 25 mM a été nécessaire à la conservation de la forme réduite des phytochélatines. En effet, suite à la validation de la méthode d'analyse des phytochélatines il a été démontré qu'elle représente un potentiel d'application. Ceci dans la mesure où l'induction des phytochélatines (PC2, PC3 et PC4) dans les algues *C. reinhardtii* a été possible à deux concentrations de Cd (1×10^{-7} M et 1×10^{-6} M) et ce, après plusieurs temps d'induction (1, 2, 4, et 6 h). Ainsi, l'étude de la stabilité des phytochélatines a été réalisée et toutes les températures examinées ont démontré une diminution des phytochélatines analysées par HPLC-ESI-MS/MS.

Il se pourrait que la cause de la dégradation des phytochélatines soit physique ou chimique plutôt que bactérienne. Toutefois, un approfondissement au niveau de la purification de la solution d'extraction serait nécessaire à la mise au point de la dite méthode analytique afin de quantifier les phytochélatines dans l'algue *C. reinhardtii*.

Mots clés

Phytochélatines, *C. reinhardtii*, LCHP-ESI-MS/MS, validation, stabilité

Abstract

Phytochelatin (PC) are polypeptides having the general structure, $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{Gly}$, where $n = 2$ to 11. Many plants respond to an elevated concentration of metals in environment, particularly Cd, by synthesizing PC. The purpose of this study was to develop a tool to assess the bioavailability of the Cd in fresh water by determining phytochelatin in algae, *C. reinhardtii*, by online HPLC-ESI-MS/MS. The goal of this work was the validation of the analytical method *i.e.* the determination of the calibration curves and the limits of detection. The addition of dithiothreitol (DTT), 25 mM, was found to be necessary to maintain the PC in their reduced form for analysis. It was shown that the liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS) technique has excellent potential for PC analysis, however, it still requires some more work with respect to sample purification. Furthermore, the stability of the PC was evaluated for different sample storage temperatures. At all temperatures studied, some degradation of PC was observed possibly due to physical rather than chemical or bacterial reasons. Finally, the induction of phytochelatin (PC2, PC3 and PC4) was observed in *C. reinhardtii* for two Cd concentrations (10^{-7} M and 10^{-6} M) and for several induction times (1, 2, 4, and 6 h).

Key words

Phytochelatin, *C. reinhardtii*, HPLC-ESI-MS/MS, validation, stability

Table des matières

Résumé en français	i
Résumé en anglais	ii
Liste des tableaux.....	v
Liste des figures	vi
Liste des abréviations	x
Remerciements	xi
1-Introduction.....	1
2-Objectifs	12
3-Théorie.....	14
3.1-La séparation par chromatographie liquide haute performance.....	14
3.2-La détection par le spectromètre de masse.....	15
3.3-Les techniques de purification	15
3.4-La validation de la méthode analytique	16
4-Méthodologie	19
4.1-Maintenance, inoculation et isolation des algues <i>C. reinhardtii</i>	19
4.2-Évaluation de la bioaccumulation du Cd par <i>C. reinhardtii</i>	21
4.3-Extraction des phytochélatines des algues.....	23
4.4-Dosage des phytochélatines (PC2, PC3 et PC4)	24
4.4.1-Développement de la méthode de séparation et de détection des phytochélatines (PC2, PC3 et PC4) par CLHP-IEN-SM/SM.....	24

4.4.1.1-Purification de l'extrait des algues à la suite de l'application du protocole d'extraction	26
4.4.2-Dosage des phytochélatines (PC2, PC3 et PC4) par CLHP détection fluorescence.....	28
4.5-Validation de la méthode analytique	29
4.6-Expérience en milieu naturel	30
5-Résultats et discussion	32
5.1-Développement de la méthode chromatographique	32
5.2-Maximisation des paramètres de la méthode chromatographique	34
5.3-Comparaison de la méthode de détection par spectrométrie de masse avec celle par fluorescence	37
5.4-Purification de la solution d'extraction des phytochélatines	40
5.5-Validation de la méthode d'analytique	50
5.6-Essai de la méthode d'analyse des phytochélatines sur des échantillons <i>ex situ</i> et <i>in situ</i>	61
6-Conclusion	64
7-Bibliographie.....	67
Annexe 1 - Diagramme de sélection du mode de séparation.....	xii
Annexe 2 – La table des valeurs de t de Student	xiii
Annexe 3 – Article à être publié dans <i>l'International Journal of Environmental Analytical Chemistry</i>.....	xiv

Liste des tableaux

Tableau I : Concentration des macronutriments et des micronutriments dans la solution de croissance (TAP + traces métaux (MT))	20
Tableau II : Paramètres du spectromètre d'absorption atomique à four graphite ...	22
Tableau III : Paramètres chromatographique et de détection des phytochélatines par CLHP-SM/SM.....	25
Tableau IV : Répétabilité analytique de l'injection de 3 μ L de la solution des standards des phytochélatines au CLHP-IEN-SM/SM avec la colonne Eclipse XDB et la colonne Jupiter Proteo. Cette solution comprend le PC2, le PC3 et le PC4 à une concentration de 1,0 mg/L dans l'eau Milli-Q	35
Tableau V : Effet mémoire suite à l'injection de 3 μ L de la solution des standards des phytochélatines au CLHP-IEN-SM/SM avec la colonne Eclipse XDB. Cette solution comprend le PC2, le PC3 et le PC4 à une concentration de 1,0 mg/L dans l'eau Milli-Q.....	36
Tableau VI : Effet-mémoire suite à l'injection de 3 μ L de la solution des standards des phytochélatines au CLHP-IEN-SM/SM avec la colonne Jupiter Proteo. Cette solution comprend le PC2, le PC3 et le PC4 à une concentration 1,0 mg/L	36
Tableau VII : Limite de détection instrumentale et limite de quantification instrumentale des PC2, PC3 et PC4 lors de l'analyse avec le CLHP-IEN-SM/SM .	56
Tableau VIII : La pente et le coefficient de régression au carré des équations linéaires des standards de phytochélatines sans ou avec la matrice d'algues selon la journée de l'expérience	59

Liste des figures

Figure 1 : Structure générale des phytochélatines (PCn).....	3
Figure 2 : Schéma général du mécanisme de détoxification des métaux traces par les phytochélatines dans les algues.....	4
Figure 3 : Étapes de la culture des algues <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	20
Figure 4 : Étapes de l'analyse du Cd internalisé dans les algues par suite à l'exposition au Cd	21
Figure 5 : Cueillette des algues à la suite à l'exposition au Cd	23
Figure 6 : Étapes de l'extraction des phytochélatines des algues.....	24
Figure 7 : Étapes pour la purification par l'extraction liquide solide (EPS).....	27
Figure 8 : Étapes pour la purification par la chromatographie d'affinité d'ion métallique immobilisé	28
Figure 9 : Étapes pour la purification par centrifugation	28
Figure 10: Schéma du SUBS	31
Figure 11: Bassin naturel de la rivière Riou Mort	31
Figure 12 : Chromatogrammes de la séparation et de la détection, par le CLHP-IEN-SM/SM avec la colonne Eclipse XDB-C18, de 3 µL de la solution des standards des phytochélatines. Cette solution comprend le PC2 (A), le PC3 (B) et le PC4 (C). La concentration de chaque analyte est de 1,0 mg/L dissous dans l'eau Milli-Q....	33
Figure 13 : Chromatogrammes de la séparation et de la détection, par le CLHP-IEN-SM/SM, de 3 µL de la solution des standards des phytochélatines. Cette solution comprend le PC2 (A), le PC3 (B) et le PC4 (C). La concentration de chaque analyte est de 1,0 mg/L dissous dans l'eau Milli-Q.....	34
Figure 14 : Chromatogrammes de la séparation et de la détection, par le CLHP-IEN-SM/SM, de 3 µL de la solution des standards des phytochélatines. Cette solution comprend le PC2 (A), le PC3 (B) et le PC4 (C) à une concentration de 1,0 mg/L dans l'eau Milli-Q. Il est à noter que la phase mobile de 0,1% d'acide formique dans l'acétonitrile a été remplacée par une solution de 0,1% d'acide formique dans le méthanol	37
Figure 15: Chromatogramme de la séparation et de la détection de 80 µL de la solution blanc (bleu) et de 80 µL des standards des phytochélatines (vert) a une concentration de 1,0 mg/L dissous dans 25 mM DTT effectuées au CLHP couplé à une détection par fluorescence	38

Figure 16: Chromatogramme de la séparation et de la détection, au CLHP détection par fluorescence, de 80 μ L de la solution blanc (vert) et de 80 μ L des standards des phytochélatines (bleu) a une concentration de 1,0 mg/L dissous dans l'eau Milli-Q **39**

Figure 17: Chromatogramme de la séparation et de la détection, par CLHP détection par fluorescence, de 10 μ L du standard des phytochélatines a une concentration de 300 μ g/L dissous dans l'eau Milli-Q **40**

Figure 18: La solution résultant de l'extraction des phytochélatines des algues (à gauche) et la même solution filtrée sur une porosité de 0,22 μ m (PVDF, Whatman) (à droite) **41**

Figure 19 : Chromatogrammes de l'injection de 10 μ L de la solution des standards des phytochélatines au IEN-SM/SM. Cette solution contient le PC2 (A), le PC3 (B) et le PC4 (C) à une concentration de 1,0 mg/L dans l'eau Milli-Q..... **42**

Figure 20 : Chromatogrammes de l'injection de 10 μ L de la solution obtenue suite au chargement de la EPS au IEN-SM/SM..... **42**

Figure 21 : Chromatogrammes de l'injection de 10 μ L de la solution obtenue suite au lavage avec le méthanol de la EPS au IEN-SM/SM..... **43**

Figure 22 : Chromatogrammes de l'injection, au IEN-SM/SM, de 10 μ L de la solution obtenue suite à l'élution de la EPS avec 10 % méthanol dans 2 % v/v d'acide formique **43**

Figure 23 : Chromatogrammes de l'injection, au IEN-SM/SM, de 10 μ L de la solution obtenue suite à l'élution de la EPS avec 2 % v/v d'acide formique dans 100 % méthanol **44**

Figure 24 : Chromatogrammes de la séparation et de la détection, par le CLHP-IEN-SM/SM, de 10 μ L de la solution des standards des phytochélatines. Cette solution contient le PC2 (A), le PC3 (B) et le PC4 (C) à une concentration de 1,0 mg/L dans l'eau Milli-Q **45**

Figure 25 : Chromatogrammes de la séparation et de la détection, par le CLHP-IEN-SM/SM, de 10 μ L de la solution après le chargement des phytochélatines..... **45**

Figure 26 : Chromatogrammes de la séparation et de la détection, CLHP-IEN-SM/SM, de 10 μ L de la solution de lavage (10 mL d'eau Milli-Q) **46**

Figure 27 : Chromatogrammes de la séparation et de la détection, par le CLHP-IEN-SM/SM, de 10 μ L de la solution de 25 mM DTT à un pH de 6,0..... **46**

Figure 28 : Chromatogrammes de la séparation et de la détection, par le CLHP-IEN-SM/SM, de 10 μ L de la solution de 25 mM DTT à un pH de 5,0..... **47**

Figure 29 : Chromatogrammes de la séparation et de la détection, CLHP-IEN-SM/SM, de 10 μ L de la solution de 25 mM DTT à un pH de 4,4..... **47**

Figure 30 : Chromatogrammes de la séparation et de la détection, par le CLHP-IEN-SM/SM, de 10 μ L de la solution de 25 mM DTT à un pH de 3,0..... **48**

Figure 31 : Chromatogrammes de la séparation et de la détection, par le CLHP-IEN-SM/SM, de 10 μ L de la solution de 25 mM DTT à un pH de 2,1.....	48
Figure 32: La solution résultante de l'extraction des phytochélatines des algues centrifugées à une force g de 11 320 (à gauche) et la même solution centrifugée à 16 320 x g (à droite)	49
Figure 33 : Chromatogrammes de la séparation et de la détection, par le CLHP-IEN-SM/SM, de 10 μ L de la solution d'extraction des phytochélatines dopées des standards des phytochélatines. La solution des standards contient le PC2 (A), le PC3 (B) et le PC4 (C) à une concentration de 1,0 mg/L dans l'eau Milli-Q.....	49
Figure 34 : Domaine de linéarité (courbe d'étalonnage) du PC2 (A), du PC3 (B) et du PC4 (C) à la suite de la séparation et la détection, par le CLHP-IEN-SM/SM, de 3 μ L des solutions des standards des phytochélatines. Ces solutions contiennent le PC2 (A), le PC3 (B) et le PC4 (C) dans l'eau Milli-Q à diverses concentrations	50
Figure 35 : Chromatogrammes de la séparation et de la détection, par le CLHP-IEN-SM (SMTV), de 3 μ L de la solution des standards des phytochélatines. Cette solution contient le PC2 (A), le PC3 (B) et le PC4 (C) à une concentration de 1,0 mg/L dans l'eau Milli-Q.....	51
Figure 36 : Chromatogrammes de la séparation et de la détection, par le CLHP-IEN-SM (SMTV), de 3 μ L de la solution des standards des phytochélatines. Cette solution est constituée du PC2 (A), du PC3 (B) et du PC4 (C) à une concentration de 1,0 mg/L dans 25 mM DTT.....	52
Figure 37 : Effet de 5 mM de DTT sur l'aire du PC2 (A), du PC3 (B) et du PC4 (C) dans la solution standard	53
Figure 38 : Effet de la concentration du DTT sur l'aire du PC2 (A), du PC3 (B) et du PC4 (C) dans la solution standard.....	54
Figure 39 : Effet de la concentration du DTT sur l'aire du PC4 dans la solution standard. Le cercle noir représente la solution sans DTT tandis que le cercle blanc symbolise celle avec l'agent réducteur.....	55
Figure 40 : Domaine de linéarité (courbe d'étalonnage) du PC2 (A), du PC3 (B) et du PC4 (C) à la suite de la séparation et la détection, par le CLHP-IEN-SM/SM, de 3 μ L des standards des phytochélatines. Les solutions contiennent le PC2 (A), le PC3 (B) et le PC4 (C) à diverses concentrations. Les phytochélatines ont été dissous dans 25 mM DTT.....	56
Figure 41 : Domaine de linéarité (courbe d'étalonnage) du PC3 à la suite de la séparation et de la détection, par le CLHP-IEN-SM/SM, de 3 μ L des standards des phytochélatines (cercle blanc) et de 3 μ L des échantillons d'algue dopés (cercle noir). Les solutions de phytochélatines sont à diverses concentrations et ils sont dissous dans 25 mM DTT.....	57

Figure 42 : Domaine de linéarité du PC2 (A), PC3 (B) et PC4 (C) à la suite de la séparation et de la détection, par le CLHP-IEN-SM/SM, de 10 µL des standards des phytochélatines (coté gauche) et de 10 µL des échantillons d'algue dopées (coté droit). Les phytochélatines sont dissoutes dans 25 mM DTT et leurs concentrations varient. L'expérience a été répétée 3 fois : la première (cercle rouge), la deuxième (cercle orange) et la troisième (triangle jaune)..... **58**

Figure 43 : Stabilité de l'aire du PC2 (A), PC3 (B) et PC4 (C) en fonction du temps selon la condition d'entreposage soit à -20°C (bleu), à 1°C (mauve) et à la température de la pièce (jaune) **61**

Figure 44: Analyse du PC2 (A), PC3 (B) et PC4 (C) à la suite de la séparation et de la détection, par le CLHP-IEN-SM/SM, de 10 µL des algues *C. reinhardtii* soumises à une concentration en Cd de 1×10^{-7} M (rond noir) et de 1×10^{-6} M (rond blanc)..... **62**

Figure 45 : Bioaccumulation des algues *C. reinhardtii* soumises à une concentration en Cd de 1×10^{-7} M (cercle noir) et à une concentration de 1×10^{-6} M (cercle blanc) effectuées au SAA..... **63**

LISTE DES ABRÉVIATIONS

MOD	Matière organique dissoute
PC	Phytochélatine
Glu	Acide glutamique
Cys	Cystéine
Gly	Glycine
Me-PC	Complexes métal-phytochélatine
SAA	Spectrométrie d'adsorption atomique
CET	Chromatographie par exclusion de taille
CI	Chromatographie ionique
CLHP-PI	Chromatographie liquide haute performance à phase inversée
PCI-SM	Spectrométrie de masse à source plasma à couplage inductif
ECZ	Électrophorèse capillaire de zone
SH	Groupe fonctionnel thiol
DTNB	<i>5,5-dithiobis (acide 2-nitrobenzoïque)</i>
mBBR	<i>monobromobimane</i>
SBD-F	<i>7-Fluorobenzofurazan-4-sulfonic acid ammonium salt</i>
OPA	<i>o-phthalaldehyde</i>
EC	Électrophorèse capillaire
TCEP	<i>Tris(2-carboxyethyl)phosphine</i>
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
MRS	Mode de détection de réactions sélectionnées
EPS	Extraction en phase solide
CAIMI	Chromatographie d'affinité d'ion métallique immobilisé
LDI	Limite de détection de l'instrument
LQI	Limite de quantification de l'instrument
LDM	Limite de détection de la méthode analytique
LQM	Limite de quantification de la méthode analytique
PC	Polycarbonate
TAP+MT	<i>Tris-Acétate-Phosphate</i> avec métaux trace
TAP-MT	<i>Tris-Acétate-Phosphate</i> sans métaux trace
IRMM	<i>Institute for Reference Materials and Measurements</i>
PVDF	Polyfluorure de vinylidène
SMTV	Spectromètre de masse par temps de vol
IEN	Ionisation par électronébulisation

REMERCIEMENTS

J'exprimer ma gratitude à tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce mémoire. En particulier, j'adresse mes remerciements à :

Kevin J. Wilkinson, professeur titulaire à l'Université de Montréal et mon directeur de recherche, pour m'avoir accueilli au sein de son groupe de recherche, sa disponibilité de tous les instants et sa précieuse aide tout au long de cette belle expérience.

Alexandra Furtos, Karine Venne, Marie-Claude Denis et Marie-Christine Tang, du Centre régional de spectrométrie de masse, pour l'encadrement et leurs conseils.

Jessie Pelchat ainsi que Pauline Abboud, stagiaires et collègues avec qui j'ai partagé mon bureau, pour leurs aides et leurs remarques pertinentes.

Les filles (Dana, Rute, Elena, Zohreh, Wing See, Caroline et Caroline) et les gars (Colin, Faraz, Chen, Thomas et Zeshi) du D-751 pour leurs conseils avisés et leurs aides.

Mon père, Momo, et ma mère, Didi, pour leurs soutiens, leurs blagues et le spa fort utile durant la phase de rédaction. Merci papa de m'avoir fait rénover ton bloc à appartements afin de me faire sortir de ma bulle et me rappeler que j'ai des muscles!

Christ, Nancy, Mouni, Phil et Adil, mes chers amis, pour votre appui et vos encouragements indéfectibles. Sincèrement, je vous remercie d'avoir suivi et participé à tous les épisodes du téléroman, fort divertissant, Ma vie, my life selon Roxy!

Mon homme, Bachir, pour ses encouragements, de son accompagnement et pour sa délicieuse cuisine.

1- Introduction :

Les métaux sont des constituants géochimiques de sources naturelles, mais avec une forte influence anthropique. Naturellement, ils sont dispersés dans les écosystèmes aquatiques par différentes voies telles que l'érosion de la croûte terrestre, les précipitations, les émissions volcaniques, etc. Cependant, les activités engagées par les humains amplifient leurs présences depuis la révolution industrielle. En effet, les diverses activités réalisées par les hommes sur les plans scientifique et technique font en sorte que les industries (agricoles, minières, etc.) laissent échapper des métaux directement ou indirectement dans l'environnement.

Certains métaux (cuivre, fer, nickel, zinc, etc.) sont essentiels pour les organismes puisqu'ils garantissent les processus biochimiques indispensables pour leur existence et la survie de leur espèce. En guise d'exemple, l'oxygène se lie au fer contenu dans l'hémoglobine et permet l'oxygénation des organes. D'autres métaux ne le sont pas mais néanmoins présents dans l'environnement comme le cadmium (ci-après, Cd), le mercure et le plomb. Qu'ils soient essentiels ou non, les métaux peuvent être cytotoxiques selon leur concentration. Effectivement, il arrive que les métaux puissent causer de sérieux dommages pour les organismes vivants, même à une faible concentration [1]. Ceci est le cas du Cd dont la dose orale létale minimum est de 350 mg chez l'être humain [2]. Il s'agit d'un métal trace libéré principalement par des industries (minière, communication, électronique, énergie et aérospatiale), la combustion d'énergies fossiles (transport urbain, etc.) ainsi que la combustion et la dégradation des matières contenant du Cd et les engrais à base de phosphate [3, 4].

Chez le phytoplancton, il s'est avéré que la présence de Cd nuit à la croissance et à la photosynthèse. De plus, il peut avoir un impact sur les concentrations de chlorophylle *a* et de l'adénosine triphosphate (ATP) intracellulaire [5]. La bioaccumulation du Cd a été observée pour plusieurs organismes aquatiques, notamment les phytoplanctons [6, 7]. Les effets cytotoxiques du Cd sur les organismes sont en fonction de la spéciation, de la concentration et du temps d'exposition à ce métal [8]. Selon les travaux réalisés par Kola [9], le flux d'internalisation augmente de façon linéaire avec la concentration de Cd^{2+} . Cela suggère que le Cd^{2+} en solution est en équilibre avec le Cd lié aux sites de transport

à la surface des algues. En effet, « la majorité des résultats permet de mettre en évidence que l'internalisation du Cd par *C. reinhardtii* pourra être prédite par les modèles basés sur les équilibres thermodynamiques » [9].

La biodisponibilité et la toxicité du Cd dépendent de sa spéciation. Dans les milieux aquatiques, les métaux peuvent exister sous la forme de cations libres ou de complexes. Ces derniers peuvent se lier à la matière organique dissoute (MOD), à des ions inorganiques et à des particules solides. De plus, le pH, la concentration en calcium, la dureté de l'eau ainsi que la concentration en matière organique dissoute sont des facteurs influençant les effets biologiques du Cd.

Afin de préserver la santé des organismes dans l'environnement, il est important de surveiller la concentration du Cd et ses effets. La biosurveillance est généralement utilisée à cette fin par le truchement de bio-indicateurs et de biomarqueurs. Ces derniers permettent la détection d'un effet induit par un changement environnemental spécifique. Durant l'évolution, les organismes aquatiques et terrestres ont développé divers mécanismes de défense pour contrer les effets des métaux toxiques. En présence d'une concentration de Cd accrue dans l'environnement, les organismes peuvent produire des peptides intracellulaires tels que les phytochélatines (PC) qui se lient aux métaux [6, 10-12]. Ces molécules pourraient être des biomarqueurs utiles pour détecter la présence de Cd dans l'écosystème aquatique. La nature de ces biomarqueurs ainsi que leur localisation sont indiquées dans l'encart 1.

La phytochélatine est un polypeptide composé de l'acide glutamique (Glu) [13], de la cystéine (Cys) et de la glycine (Gly). La structure générale est $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ où la chaîne n peut avoir une longueur entre 2 et 11 unités (Figure 1) [11, 14]. Des études ont démontré que, chez plusieurs espèces d'algues marines et dulcicoles, l'exposition au Cd engendrait une augmentation de la concentration intracellulaire de phytochélatines [6, 15-17]. Ainsi, ils jouent un rôle important dans la détoxification des métaux et dans l'homéostasie des ions métalliques [11, 12, 18, 19]. La synthèse de phytochélatines requiert la présence du métal dans leur milieu et est en corrélation avec sa hausse de concentration [7, 20].

<p>Encart 1- Découverte, structure, synthèse et localisation des phytochélatines :</p>

Les molécules induites lors d'une exposition au métal sont regroupées dans deux catégories distinctes : les métallothionéines et les phytochélatines. Ces derniers chélatent le métal en se liant au soufre des groupements fonctionnels thiols qui sont situés dans les résidus cystéines des phytochélatines. Celles-ci sont des polypeptides synthétisés par des enzymes tandis que les métallothionéines sont des protéines encodées génétiquement. Les métallothionéines de classe I se retrouvent dans plusieurs vertébrés. Les métallothionéines de la classe II se distinguent par leur induction dans les cyanobactéries, les algues et les plantes supérieures [12, 19]. Elles ont été répertoriées dans la majorité des plantes supérieures [11], la plupart des algues [6] et chez certaines espèces de mycètes [21] qui sont exposées à des métaux.

Les métallothionéines de classe I ont été les premières à être découvertes. Par la suite, des polypeptides à chaînes courtes, ayant la capacité de se lier aux ions Cd^{2+} , ont été isolés d'une plante supérieure (*Rauvolfia serpentina*) et elles ont été nommées phytochélatines [11]. Par contre, lorsque les métallothionéines de classe II furent découverts dans les plantes supérieures, il a été proposé de changer le nom de phytochélatines par métallothionéines de classe III [12, 19]. Les deux noms sont maintenant utilisés dans la littérature, mais on remarque une nette préférence pour celui de phytochélatine.

La structure des phytochélatines induite dans le *R. serpentina* fût établie en 1985 [11] et confirmée par d'autres équipes [22] (Figure 1). Il est important de noter que l'acide glutamique n'est pas lié avec la cystéine en alpha (α) sur le groupement carbonyle comme pour un acide aminé transcriptional, mais en gamma (γ) avec ce dernier [11, 23]. De plus, il existe un certain nombre de structures dérivées qui varient de la structure générale. Par exemple, $(\gamma\text{Glu-Cys})_n\text{-Glu}$, $(\gamma\text{Glu-Cys})_n\text{-Ser}$ et $(\gamma\text{Glu-Cys})_n\text{-}\beta\text{Ala}$ qui ont été identifiées dans certaines espèces végétales [10, 19, 24].

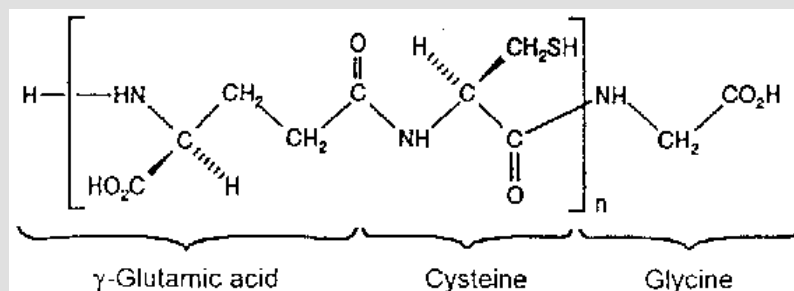


Figure 1 : Structure générale des phytochélatines (PCn).

Pour des expériences avec la *Silene cucubalis* (une plante supérieure), il a été démontré qu'une enzyme, la phytochélatine synthase, catalyse la formation de phytochélatines en laboratoire (*in vitro*) [23]. Elle est aussi nommée la γ -glutamylcystéinyl dipeptidyle transpeptidase (E.C. 2.3.2.15) [25]. L'enzyme cytosolique catalyse la partie $\gamma\text{-Glu-Cys}$ du glutathion sur un deuxième glutathion pour former la phytochélatine 2 (PC2) ou sur une molécule de PCn pour produire un oligomère $n+1$ (Figure 2) [6, 10, 23]. Strasdeit *et coll.* [26] ont isolé des complexes de phytochélatines provenant de plantes à tabac. L'analyse par spectroscopie d'absorption des rayons X a démontré que le Cd était coordonné à quatre thiols. Généralement, le rapport quantitatif entre les phytochélatines et l'ion

métallique n'est pas constant, mais la stabilité du complexe augmente en fonction de la longueur de la chaîne de la phytochélatine [27].

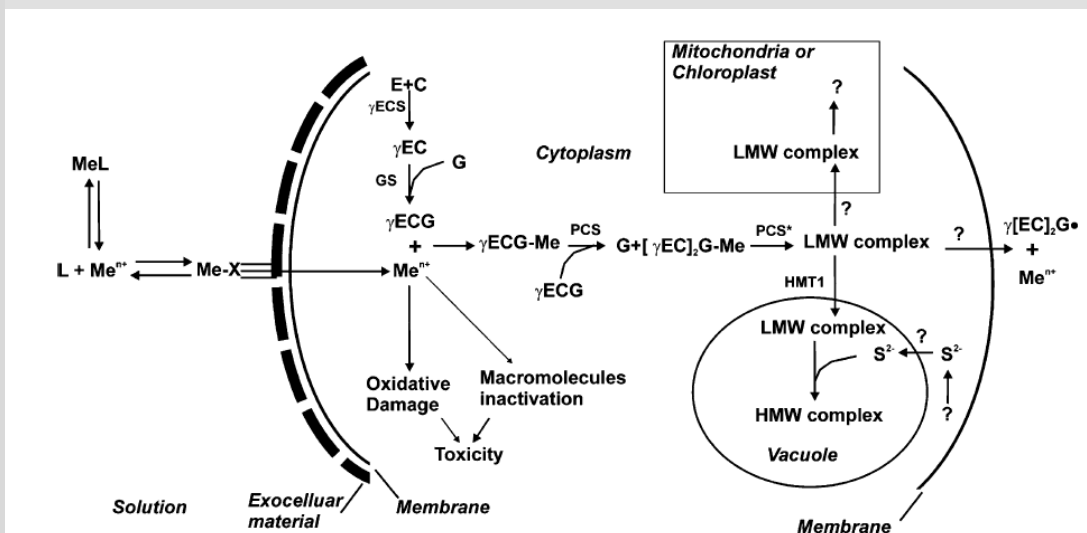


Figure 2 : Schéma général du mécanisme de détoxification des métaux traces par les phytochélatines dans les algues. Abréviations : (MeL) complexe métallique en solution, (Me^{n+}) ion libre du métal trace, [28] ligand biotique exocellulaire, (E) acide glutamique, (C) cystéine, (G) glycine, (γEC) gamma glutamylcystéine, (γECG) glutathion, ($(\gamma EC)_2G$) métallothionéine $n = 2$, (LMW) molécule de faible poids moléculaire, (HMW) molécule haut poids moléculaire, (γECS) gamma glutamylcystéine synthase, (GS) glutathion synthase, (PCS) phytochélatine synthase, (HMT1) transporteur vacuolaire ABC [19].

Le complexe métal-phytochélatine réside généralement dans la vacuole (Figure 2) [10]. Ceci a été découvert dans l'algue *Dunaliella bioculata* et mis en évidence dans la moisissure *S. pombe* [19]. Ces complexes se partitionnent à l'intérieur du cytoplasme pour faciliter la surveillance de la concentration des métaux, prévenir et neutraliser leurs effets toxiques potentiels [10].

D'autre part, des ions sulfures sont présents avec certains complexes métal-phytochélatine [6]. Ils jouent un rôle important dans l'efficacité de la détoxification. En fait, l'incorporation de ces ions au complexe augmente le nombre de Cd par complexe et améliore sa stabilité [10]. Il a été rapporté que l'algue *P. tricornutum* exposée au Cd produit des complexes de phytochélatines et que certains de ses complexes sont stabilisés par des ions sulfures [29]. La liaison de l'ion sulfure avec le complexe permet de créer deux catégories de phytochélatine : les molécules de faible poids moléculaire formées uniquement du métal avec la phytochélatine et celles de haut poids moléculaire qui contiennent aussi des ions sulfures [29]. Dans le complexe, deux types de coordination du Cd avec un ou deux atomes de soufre ont été proposés [30].

Il a été démontré que la synthèse des phytochélatines dans les algues est activée fortement par la présence de Cd, mais aussi par celle du cuivre, du plomb, du

mercure et du zinc [7, 11, 18, 31]. De plus, la relation entre la quantité de métal dans l'organisme et la quantité de phytochélatines n'est pas nécessairement directe, celle-ci peut varier selon différents paramètres, à savoir: les différences d'une espèce à une autre, le degré de toxicité des ions et de leurs interactions ainsi que la portion de métal qui atteint le cytoplasme [5-7, 17].

Puisque l'évolution d'un métal dans un organisme vivant se produit par son interaction avec des ligands, et que ce nouveau complexe peut impliquer un certain nombre d'espèces avec différentes propriétés, la mesure de la concentration totale en métal ne représente pas assurément la biodisponibilité de cet élément. D'autre part, les études réalisées au sujet de l'exposition des métaux traces ont démontré différents moyens de défense de l'organisme contre ceux-ci. Une immobilisation des métaux au niveau de la paroi cellulaire et l'activation de protéines chélatantes ont, entre autres, été découvertes. Cependant, la captation des métaux traces par les phytochélatines est un important mécanisme de défense de l'organisme contre l'agression de ces métaux.

Il a été découvert aussi que la synthèse des phytochélatines est liée au degré de contamination dans l'écosystème aquatique. Ahner et coll. [15] ont détecté dans les phytoplanctons, contenus dans une baie de Grande Bretagne reconnue pour des rejets de métaux, la présence de phytochélatines. Le résultat de cette étude *in situ* a démontré que la concentration de phytochélatine croît en fonction du rapprochement de la source. Ceci suggère que l'étude des phytochélatines permet de les utiliser comme biomarqueurs de métaux traces dans les eaux [32-34]. Par contre, peu de recherches sur l'induction des phytochélatines dans les algues ont été effectuées, et elles ont rarement été conduites à des concentrations réelles de métal contenu dans l'environnement et encore moins dans les eaux douces [31, 35-37]. Il faudrait noter que la relation linéaire entre la concentration du métal et la production de phytochélatines a été démontrée dans des échantillons d'algues marines au laboratoire [38].

Par ailleurs, d'autres études réalisées en laboratoire, mais aussi *in situ*, ont démontrées la formation des phytochélatines. La présence de phytochélatines dans les phytoplanctons exposés à des concentrations élevées de Cd a été établie [6, 35]. Par contre, le milieu d'exposition était simple et ne ressemblait pas au milieu

naturel. De plus, l'induction de phytochélatines dans les algues a été rendue possible à de faibles concentrations de Cd. En 1995, Ahner et coll. [7] ont réalisé des expériences préliminaires *ex situ* simulant l'eau salée naturelle. Environ 500 $\mu\text{mol PC2/g}$ de Chl *a* a été induite suite à une exposition de l'algue marine *T. weissflogii* durant 22 h à une solution de 30 nM de Cd [7]. Puis, ils ont démontré que plusieurs espèces de phytoplanctons marins avaient produit ces polypeptides à de basses concentrations de Cd. Il est important de spécifier que, bien que les concentrations de Cd lors des expériences d'Ahner en milieu naturel soient faibles, elles étaient quand même au-dessus de celles retrouvées dans les eaux salées. Une étude réalisée *in situ* dans des ports au sud-est de la Nouvelle-Angleterre a révélé que les différentes espèces de phytoplanctons produisaient entre 2 à 50 $\mu\text{mol PC2/g}$ de Chl *a* [15].

Méthodes d'analyse des phytochélatines :

Plusieurs techniques et méthodes ont été utilisées pour caractériser les phytochélatines et leurs complexes. Cette section présente un résumé des différents procédés. Elle est divisée en deux parties : l'analyse des complexes métal-phytochélatine (Me-PC) et la seconde, l'analyse des phytochélatines (PC).

a) Analyse du complexe Me-PC :

À la suite de la découverte des phytochélatines, vers la fin des années soixante-dix, les premières analyses des complexes ont impliqué une séparation par une série de fractionnements en utilisant la chromatographie sur colonne (par exemple la filtration sur gel). Les analyses séparatives ont été suivies par celles dites immunologiques [39]. Par la suite, plusieurs techniques et méthodes ont été employées pour la caractérisation du complexe telles que les méthodes potentiométriques et celle de la spectroscopie d'absorption des rayons X (XANES, EXAFS) [40]. Souvent, la spéciation du métal a été réalisée grâce à l'utilisation des techniques d'ultrafiltration et de dialyse, de chromatographie liquide pour la séparation des différentes espèces du métal, la spectrométrie d'absorption atomique (SAA) ou par l'activation neutronique [37, 41]. Cependant, toutes ces méthodes ont semblé être peu convenables pour l'analyse du complexe, puisque le processus est long et peut avoir comme conséquence l'oxydation des groupements

thiols et une décomposition du complexe. Cet aspect méthodique sera traité ultérieurement.

La chromatographie bidimensionnelle peut être un moyen très utile pour éviter les interférences provenant de la matrice. Lors de la première étape, les analytes sont séparées efficacement du reste de la matrice par chromatographie. Cela se fait habituellement par la chromatographie par exclusion de taille (CET). En raison de la faible résolution de la chromatographie par exclusion de taille, la chromatographie ionique (CI) et la chromatographie liquide haute performance à phase inversée (CLHP-PI) ont été utilisées pour séparer les phytochélatines. Ainsi, le pH neutre préserve le complexe métal-phytochélatine [8].

D'autre part, les méthodes voltampérométriques [42] ont été utilisées pour étudier la phytochélatine et les interactions de celui-ci avec les ions des métaux traces (Cd). Il est effectivement possible d'analyser ces complexes avec la polarographie [42] ou par dosage coulométrique [43]. Ensuite, la polarographie impulsionnelle différentielle (PID) fournit des signaux pour les différentes espèces : le peptide libre, l'ion métallique libre et le métal complexé au peptide [1, 44].

Pour la caractérisation de la phytochélatine liée au métal, durant la dernière décennie, une attention particulière a été portée à CLHP couplée à la spectrométrie de masse à source plasma à couplage inductif (PCI-SM). Il est rapporté que la CLHP est performante en ce qui concerne la séparation des phytochélatines et que l'PCI-SM a une sensibilité élevée pour leur détection [45]. Cependant, l'utilisation d'un modificateur organique à concentration élevée dans la phase mobile rend cette technique incompatible avec l'PCI-SM [46-48]. Parmi les techniques de séparation, la chromatographie par exclusion de taille est considérée comme la plus appropriée lors du couplage avec l'PCI-SM. Cela serait dû aux débits (0,7-1,0 mL/min) et à la composition des phases mobiles utilisées dans cette technique. Notons ici que ceux-ci sont tolérés par l'PCI-SM [46-48].

Bien que différentes approches analytiques pour étudier la spéciation élémentaire des métaux et de leurs complexes dans les plantes aient été proposées, le couplage de la chromatographie par exclusion de taille à l'PCI-SM est la plus couramment utilisée pour la détection des complexes métalliques formés [49, 50]. La spectrométrie d'émission atomique par plasma à couplage induit a aussi été

utilisée pour l'analyse de la spéciation du métal dans les complexes [46-48]. Néanmoins, l'instabilité des complexes métal-phytochélatines pendant la séparation a toujours suscité une incertitude [51]. Ainsi, le couplage direct de l'électrophorèse capillaire de zone avec la spectrométrie de masse (ECZ-IEN-SM) permettrait l'analyse des phytochélatines avant l'oxydation sans avoir recours à un agent réducteur. Il a été démontré aussi que l'électrophorèse capillaire de zone (ECZ) couplée à un détecteur de métaux tel que la spectrométrie d'absorption atomique (SAA), la source plasma à couplage inductif (PCI) ou la spectrométrie de masse à source plasma à couplage inductif (PCI-SM) a offert une amélioration substantielle sur le plan de la sensibilité et de la résolution pour l'analyse des phytochélatines [39, 50, 52-54]. En plus de ces méthodes de détection indirecte, le complexe Me-PC a été analysé directement par la spectrométrie de masse (IEN-SM) [54-56] ou par le couplage de la ECZ-IEN-SM/SM [56, 57].

b) Analyse des phytochélatines libres :

Dans les années 80, la technique proposée pour l'analyse des phytochélatines est la CLHP-PI [58, 59]. La forte absorption des peptides dans la région ultraviolette (200-220 nm) fournit une méthode de détection universelle. Cependant, il y a un manque marqué de sélectivité [59]. Par conséquent, des étapes additionnelles pour la purification de l'échantillon avant l'analyse sont nécessaires.

Conséquemment, la méthode suivante de la détermination des phytochélatines a été fondée sur les propriétés du groupement fonctionnel thiol (SH) appartenant à l'acide aminé cystéine présent dans les peptides [59]. La dérivation avec un composé chromophore ou fluorophore spécifique fournit une meilleure sélectivité lors de la détection puisque les composés réagissent avec le groupement thiol et permettent leur détection par spectrométrie d'absorption dans l'ultraviolet (UV), le visible (Vis) ou par fluorescence [59].

Durant les années subséquentes à la découverte des phytochélatines, deux réactifs ont été utilisés afin de dériver le groupement thiol des phytochélatines. L'un d'eux est le réactif d'Ellman, *5,5-dithiobis (acide 2-nitrobenzoic)* (DTNB). La dérivation a lieu après la séparation des peptides par CLHP-PI [58, 59]. Les groupes SH des peptides réagissent avec le DTNB pour produire le *2-nitro-5-thiobenzoate*, qui a une

absorbance UV maximale à 412 nm. L'autre méthode utilise le réactif *monobromobimane* (mBB) pour effectuer la réaction de dérivation avant la séparation des phytochélatines par CLHP-PI [58, 59].

Le mBB a été l'un des composés les plus utilisés pour dériver les thiols des phytochélatines puisque cette méthode pouvait détecter des niveaux plus bas de phytochélatines qu'avec le réactif DTNB. Une comparaison entre les deux réactifs a été réalisée et il a été démontré que le mBB était le plus sensible. Ce résultat s'explique dans la mesure où la spectrométrie de fluorescence est plus sensible que la spectrophotométrie UV-Vis [27, 59]. Par contre, les deux agents ne sont pas spécifiques aux phytochélatines puisque n'importe quel composé contenant des groupements thiols pourrait interférer lors de l'analyse [58].

Dans le cas des phytoplanctons, seulement le mBB et le *7-Fluorobenzofurazan-4-sulfonic acid ammonium salt* (SBD-F) ont été rapportés pour la dérivation des phytochélatines par la détection par fluorescence [5]. L'utilisation du réactif de dérivation SBD-F lors de l'analyse exige des détecteurs à fluorescence très sensibles. Il est aussi possible d'utiliser le réactif de dérivation *o-phthaldialdehyde* (OPA) pour cette analyse. Cependant, les dérivés de l'OPA sont stables seulement sur de courtes périodes (3 h) et les réactions secondaires de l'OPA avec les groupes aminés des peptides pourraient se produire et ainsi limiter l'analyse [5]. Bien que l'application du DTNP dans l'analyse des phytochélatines induites par les plantes supérieures ait donné de bons résultats, ce réactif ne serait pas assez sensible pour la détermination des phytochélatines produites par le phytoplancton [5].

L'étude des effets de l'entreposage sur les dérivés des phytochélatines a été réalisée [5]. Il a été rapporté que les dérivés du SBD-F et du mBB sont stables à 4 °C dans l'obscurité pendant 10 jours et 6 semaines respectivement [5]. De plus, la dégradation des dérivés du mBB sur une période de 30 jours ne démontre pas de pertes significatives [5].

Plus tard, dans le milieu des années 90, les méthodes voltampérométriques telles que la voltampérométrie à redissolution [43, 58] et la polarographie [5] permettent une mesure directe des thiols. Par comparaison, la méthode voltampérométrique

permet d'obtenir une sensibilité environ 1000 fois plus grande que la méthode dérivative utilisant le réactif d'Ellmans [43].

La ECZ est une technique utilisée pour l'analyse qualitative et quantitative des peptides [59]. La ECZ offre plusieurs avantages par rapport au CLHP dont l'emploi de peu de réactifs et un temps d'analyse plus rapide [59]. Par contre, la ECZ et le CLHP sont sensibles, mais ne sont pas spécifiques aux thiols des phytochélatines. La purification de l'échantillon est généralement nécessaire avant la détection de phytochélatines, ce qui prolonge la durée de l'analyse. Néanmoins, ce problème est allégé lors de l'analyse par ECZ au moyen de la dérivation avec différents réactifs spécifiques aux thiols (par exemple le *N-ethylmaleimide* et le *4 aminosulfonyl-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole*) précédant la séparation [59].

Durant la dernière décennie, l'identification des phytochélatines a été accomplie par la spectrométrie de masse, seule (IEN-SM) ou en tandem (IEN-SM/SM) [5, 54, 58, 60]. Cette dernière est plus sensible et sélective que la spectrométrie de masse seule. Selon la littérature, la purification et l'isolation des phytochélatines de leur matrice tissulaire sont effectuées par la chromatographie d'échange anionique, la chromatographie d'exclusion par taille et la chromatographie liquide à haute performance à phase inversée [60]. Il est aussi possible de coupler l'électrophorèse capillaire (EC) à la détection par spectrométrie de masse et de permettre la mesure de la sélectivité des thiols contenus dans les phytochélatines [5]. Le couplage de CLHP-PI et de la détection par spectrométrie de masse a des limites de détection de l'instrument (LDI) de l'ordre de la femtomole lorsqu'elle est employée pour la détermination des thiols oxydés et réduits, chez les fluides animaux [5]. Cette technique est qualifiée de prometteuse pour les échantillons environnementaux.

Un des facteurs limitant l'analyse des phytochélatines, une fois isolés de la cellule, est leur sensibilité à l'oxydation de ses groupements thiol. La préparation rapide lors du protocole analytique et l'analyse immédiate devraient avoir lieu afin d'éviter la dégradation et les pertes des composés [58]. Ainsi, la plupart des méthodes sont trop longues pour une détermination quantitative des phytochélatines. Une méthode en ligne du CL-IEN-SM/SM pourrait remédier à cette situation [58].

Les peptides oxydés peuvent retrouver leurs formes réduites par la réduction du groupement thiol en utilisant le *tris(2-carboxyethyl)phosphine* (TCEP) ou le *dithiothreitol* (DTT). Il a été mentionné que le réactif TCEP est plus stable mais plus coûteux que le DTT [5, 58]. Cependant, son utilisation a un avantage par rapport au DTT puisque le temps de réaction est plus court. Le réactif TBP a aussi été employé avec succès pour réduire les liaisons disulfides, mais ce réactif est corrosif et fortement volatil [5].

En résumé, malgré trois décennies de recherche sur ce sujet la revue de la littérature scientifique concernant les phytochélatines révèle les potentialités des études exploratoires menées à ce jour. Dès lors, plusieurs ramifications possibles de la recherche sur le sujet sont à approfondir et d'autres, inexplorées, à découvrir.

2-Objectifs :

L'objectif de cette étude consiste à développer un outil analytique pour évaluer la biodisponibilité du Cd dans les eaux douces. Plus précisément, la quantification des phytochélatines induites dans les algues *Chlamydomonas reinhardtii* permet leur utilisation comme biomarqueur en réponse à l'exposition au Cd dissous.

Pour ce faire, la première étape de ce travail a été de développer les méthodes séparative et celle concernant la détection d'un mélange de standards de phytochélatines (PC2, PC3 et PC4) dans une matrice simple : l'eau. La méthode de séparation choisie est la chromatographie liquide haute performance en phase inversée (CLHP-PI). Elle est couplée au détecteur qui forme le spectromètre de masse en tandem (avec ionisation par électronébulisation (IEN) comprenant les analyseurs à triple quadripôle) en mode détection de réactions sélectionnées (MRS) (traduction de l'auteur de *selected reaction monitoring*). Le processus consiste, dans un premier temps, à valider la présence des phytochélatines provenant de la solution des standards, puis, dans un deuxième temps, à développer un gradient d'élution permettant leur séparation.

Par la suite, la validation de la méthode analytique des phytochélatines extraits des algues suite à l'exposition au Cd est effectuée. Cette dernière comprend la préparation de l'échantillon et l'analyse des phytochélatines. D'abord, la recherche devrait démontrer la spécificité de cette méthode. Ensuite, elle devrait prouver la justesse, la précision et le recouvrement des analyses. Subséquemment, l'étude devrait déterminer la courbe de standards et établir une comparaison au niveau de la sensibilité de la détection entre la spectrométrie de masse et la fluorescence. Enfin, la stabilité des phytochélatines dans l'extrait d'algue devrait être étudiée.

Comme suite logique au développement et à la validation de la méthode de quantification des phytochélatines, celle-ci est mise à l'épreuve sur des échantillons d'algues exposés au Cd. Dans un premier temps, la méthode est appliquée à des algues exposées au Cd en laboratoire. La concentration en métaux et le temps d'exposition des algues sont variés. Ceci permet de déterminer le temps d'exposition optimal pour maximiser l'induction des phytochélatines dans les algues, d'étudier l'effet de la concentration en Cd et le domaine de concentration permettant la production des phytochélatines. Finalement, la quantification des

phytochélatines est réalisée sur des échantillons d'algues provenant d'une exposition naturelle au Cd.

3- THÉORIE :

3.1-La séparation par chromatographie liquide haute performance :

Les méthodes séparatives servent à séparer, identifier et quantifier les analytes d'un mélange plus ou moins complexe. La séparation est fonction des propriétés physico-chimiques des molécules. Dans cette étude, les phytochélatines ont été séparées par la chromatographie liquide haute performance.

Le principe de la chromatographie en phase liquide réside dans le phénomène d'adsorption de l'analyte sur la phase stationnaire et par sa désorption. Ceci est rendu possible en augmentant le pourcentage de solvant organique dans le gradient d'élution des phases mobiles. La qualité de la séparation par la chromatographie peut être perturbée par plusieurs facteurs : la phase stationnaire, le type de ligand, la composition de la phase mobile, le diamètre des orifices de la phase stationnaire, la taille des particules, la dimension de la colonne, la température de la colonne et les additifs à la phase mobile.

La chromatographie liquide offre un choix varié de phases stationnaires. Sa sélection dépend de la nature des solutés à séparer et détermine le type de solvant (polaire ou peu polaire) à employer. La séparation de la phytochélatine 2 (PC2, masse moléculaire de 540,6 g/mol), de la phytochélatine 3 (PC3, masse moléculaire de 772,9 g/mol) et de la phytochélatine 4 (PC4, masse moléculaire de 1004,1 g/mol) est effectuée par chromatographie liquide haute performance à phase inverse. Ce choix a été effectué sur la base de la masse molaire, la polarité des composés à séparer et leurs solubilités dans le solvant. En effet, les phytochélatines se différencient par leurs groupements polaires (Glu-Cys)_n où n = 2 à 11. Ils sont solubles dans les solvants polaires tels que l'eau, le méthanol et l'acétonitrile. Un diagramme de sélection a été annexé à ce document (v. Annexe 1) afin d'évaluer le type de chromatographie appropriée pour séparer les phytochélatines.

3.2-La détection par le spectromètre de masse :

L'un des avantages des détecteurs spécifiques, tel le spectromètre de masse, réside dans le fait que sa détection est liée à une propriété unique du composé. La source d'ionisation est suivie d'un ou plusieurs analyseurs qui séparent les ions produits selon leur rapport m/z . Le résultat obtenu est un spectre de masse représentant les rapports m/z des ions détectés en fonction de l'axe des abscisses, et l'abondance relative des ions selon l'axe des ordonnées. L'introduction de l'échantillon peut se faire directement dans la source (l'infusion directe) ou suite à son association à une méthode séparative (chromatographie liquide, chromatographie gazeuse, électrophorèse capillaire). Dans le cas de cette étude, les composés ont été séparés par la chromatographie liquide haute performance à phase inverse et introduits dans la source d'ionisation, un électro-ébuliseur. Par la suite, les ions ont été séparés par l'analyseur triple quadripôle. L'ionisation par l'électro-ébulisation a une limite de détection de l'ordre d'environ une femtomole [61]. Le triple quadripôle permet l'analyse de masse en tandem ; c'est-à-dire que l'ion parent à étudier est sélectionné par le premier quadripôle et fractionné dans la cellule à collision, puis le second analyseur focalise sur l'ion produit. Ainsi, l'analyse du spectromètre en tandem est plus spécifique que le quadripôle uniquement.

3.3-Les techniques de purification :

Malgré les performances de la détection par spectrométrie de masse, il arrive que la sensibilité et la sélectivité soient moindres que les attentes. Ceci est souvent dû à la suppression du signal de l'analyte d'intérêt qui est généralement associée à la complexité de la matrice de l'échantillon. L'interférence peut aussi affecter l'ionisation des molécules d'intérêt. Ainsi, il existe une multitude de méthodes pour tenter d'éliminer les ions interférents de l'échantillon telle que l'extraction sur phase solide. Plusieurs méthodes aboutissent donc à un enrichissement de l'analyte d'intérêt. Elles se différencient par leur efficacité quant il s'agit d'enlever les ions supprimeurs.

Les techniques de purification qui ont été étudiées ici sont les cartouches d'extraction en phase solide (EPS), les cartouches utilisant la chromatographie d'affinité d'ion métallique immobilisé (CAIMI) et la centrifugation. L'extraction en

phase solide consiste à faire passer la solution de l'échantillon à travers un adsorbant sous forme solide où les analytes d'intérêts seront adsorbés sur cette phase. Les autres composés de la matrice sont rincés avec un solvant approprié. L'élution des analytes est ensuite accomplie en utilisant un éluant adéquat.

La chromatographie d'affinité d'ion métallique immobilisé est, quant à elle, une technique qui permet d'immobiliser un atome métallique sur la phase stationnaire et de former des liens de coordination avec des polypeptides. Dans ce cas, l'abaissement du pH va permettre de réduire le polypeptide, le lien métal-polypeptide sera rompu et, ainsi, il y a élution du polypeptide. Ces deux types d'extractions sont à la fois rapides, reproductibles et sélectifs.

3.4-La validation de la méthode analytique :

La validation permet de prouver que la méthode d'analyse (échantillonnage, préparation de l'échantillon et méthode instrumentale) développée par le laboratoire est apte à l'application prévue. De ce fait, la méthode d'analyse qui a été développée pour quantifier les phytochélatines induites par le Cd dans les algues *C. reinhardtii* doit subir une validation interne. Elle repose sur le *Protocole pour la validation d'une méthode d'analyse en chimie* du Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec [62] et le *The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics* de Eurachem (un réseau européen) [63].

Le protocole de validation est élaboré sur la base de la norme internationale ISO/CEI 17025. Il constitue une référence pour « un grand nombre de laboratoires œuvrant dans le domaine de l'analyse environnementale » au Québec [62]. Quant au guide proposé par Eurachem, il s'appuie sur la norme européenne [63]. Qu'on se réfère à l'un ou l'autre des documents cités ci-avant, il est important de démontrer que la méthode d'analyse est spécifique à la détection des phytochélatines et d'évaluer sa fidélité, sa justesse, sa linéarité (courbe de standard) et sa sensibilité. Finalement, la stabilité des phytochélatines dans l'extrait d'algue doit être démontrée.

La spécificité de la méthode d'analyse est définie comme étant « la propriété d'une méthode analytique de convenir exclusivement à l'analyte avec la garantie que le

résultat de l'analyse ne provient que de cette molécule » [63]. La fidélité et la justesse sont généralement évaluées à la suite de la spécificité de la méthode. « La fidélité s'exprime sous forme de réplicabilité pour une méthode » et « elle est l'étroitesse de l'accord entre les résultats » [64]. Elle a été calculée selon l'Équation 1 où $t_{(0,975; n-1)}$ représente la valeur de Student pour un intervalle bilatéral à un seuil de confiance à 95% (v. Annexe 2), s est l'écart-type sur dix répliquas et n est égal au nombre de répliquas :

$$\text{Réplicabilité} = t_{(0,975; n-1)} \times s / \sqrt{n} = 2,262 \times s / \sqrt{10} \quad (\text{Eq. 1})$$

La justesse représente « l'étroitesse de l'accord entre la valeur de référence et le résultat moyen » [64]. Elle s'exprime par le pourcentage de justesse [64] :

$$\text{Pourcentage de justesse} = (100 - \text{erreur relative}) \% \quad (\text{Eq. 2})$$

Et l'erreur relative est :

$$\text{Pourcentage d'erreur relative} = |(V_0 - V_s)/V_s| \times 100 \% \quad (\text{Eq. 3})$$

où V_0 est la moyenne des valeurs expérimentales et V_s est la valeur de référence.

Une autre caractérisation de la méthode analytique est la détermination du domaine de linéarité de la courbe d'étalonnage [64]. Il est possible de calculer la limite de détection et la limite de quantification des analytes à la suite des résultats obtenus lors de la détermination du domaine de linéarité de la courbe d'étalonnage [64]. La sensibilité informe l'analyste des changements des conditions de l'appareil au fil du temps [64]. Cette caractéristique peut être exprimée par la pente moyenne obtenue lors de l'évaluation du domaine de linéarité [64].

La « limite de détection » (LD) est « la plus petite concentration ou teneur en analyte pouvant être détectée, avec une incertitude acceptable, mais non quantifiée dans les conditions expérimentales » [63]. La « limite de quantification » (LQ) est « la plus petite concentration ou teneur en analyte pouvant être quantifiée, avec une incertitude acceptable, dans les conditions expérimentales » [63]. Il est important de faire la différence entre la limite de détection de l'instrument (LDI), la limite de quantification de l'instrument (LQI), la limite de détection de la méthode analytique (LDM) et la limite de quantification de la méthode analytique (LQM). La LDI et la LQI sont obtenues à partir de la solubilisation des standards de phytochélates

dans l'eau Milli-Q tandis que la LDM et la LQM sont acquises en réponse à l'utilisation de la méthode analytique sur un échantillon d'algues non exposées au Cd puis dopées avec les standards de phytochélatines [64].

Il existe plusieurs méthodes pour calculer la LD et la LQ. Ici, celle privilégiée pour définir ses limitations consiste à estimer la concentration correspondant à trois fois l'écart-type de la réponse de la solution la moins concentrée [64].

$$LD_{\text{estimée}} = 3 \times s_{\text{solution}} \quad (\text{Eq. 4})$$

À partir de la LD estimée, l'écart-type (s) peut être calculé sur dix répliquas d'une solution de phytochélatine ou d'une solution témoin (blanc) [64]. La concentration en phytochélatine doit se situer entre cinq et sept fois la concentration de la LD estimée [64]. Pour sa part, la LD correspond à la concentration de trois fois l'écart-type (s) de la solution (voir équation 4). Alors que la LQ correspond à 10 fois ce même écart-type (s) (voir équation 5) [64].

$$LD = 3 \times s_{\text{répliqua}} \quad (\text{Eq. 5})$$

$$LQ = 10 \times s_{\text{répliqua}} \quad (\text{Eq. 6})$$

4- MÉTHODOLOGIE:

Tous les récipients utilisés lors de la culture des algues et de leur exposition au Cd étaient en polycarbonate (PC) (Nalgene). Tous les cylindres gradués, les microtubes et les tubes pour centrifugation étaient en polypropylène. Tous les récipients, filtres, les tubes pour centrifugation, les microtubes et les cylindres gradués furent trempés durant une journée dans une solution de 0,1 M d'acide nitrique (Sigma-Aldrich), rincés six fois avec l'eau Milli-Q provenant d'un système de purification de Millipore ($R \geq 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$; $\text{TOC} \leq 2 \text{ }\mu\text{g/L}$) et séchés dans une hotte à flux laminaire (HERAsafe, Heraeus).

4.1-Maintenance, inoculation et isolation des algues *C. reinhardtii*:

La souche de *C. reinhardtii* sélectionnée pour cette étude était le type sauvage WT-2137 obtenu du *Chlamy Center* de *Duke University*. Il a été reçu et maintenu sur une plaque 1,5% m/v d'Agar (Fluka, Sigma-Aldrich). La plaque contenant la culture d'algue a été mise à la clarté et à la température ambiante du laboratoire pendant une semaine avant d'être utilisée pour l'inoculation. Elle a été conservée pendant un maximum d'un mois avant d'être transférée sur une nouvelle plaque d'Agar. Toutes les inoculations ont été réalisées avec une loupe stérile, sous atmosphère stérilisée à la flamme et où le rebord de la fiole conique a aussi été stérilisé à la flamme.

Une petite quantité, équivalant à un grain de poivre, d'algues a été prélevée de la plaque d'Agar et inoculée dans une solution de croissance préalablement stérilisée. Le milieu de croissance était une solution TAP (Tris-Acétate-Phosphate) (dilué 4x). Cette solution était composée de 3 solutions mères : i) Tris acétate (40x), ii) Beij (40x) et iii) métaux traces (4000x) (voir le Tableau I). Le pH de la solution de TAP est de 7,0. La solution d'algues obtenue ci-dessus, nommée Diaz 0, a été incubée à 20 °C avec une agitation circulaire de 100 rpm (Multitron, Infors HT) sous un cycle de 12 h de lumière ($50 \text{ }\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$) et 12 h d'obscurité jusqu'à l'obtention d'une densité cellulaire située entre $1,5 \times 10^6 \text{ cel./mL}$ et $3,0 \times 10^6 \text{ cel./mL}$. Cette région de densité cellulaire représente une partie de la phase exponentielle de croissance des algues. La densité cellulaire ainsi que la densité de surface ont été mesurées avec le compteur de particules (Multisizer 3, Beckman Coulter). Lorsque la solution Diaz 0 à la densité cellulaire désirée, elle a été diluée à $1 \times 10^5 \text{ cel./mL}$.

dans la solution de croissance. Cette solution, Culture 1, a été incubée sous les mêmes conditions précédemment jusqu'à une densité cellulaire se situant dans la phase exponentielle.

Tableau I : Concentration des macronutriments et des micronutriments dans la solution de croissance (TAP + traces métaux (MT))

Macronutriments (i,ii) (M)		Micronutriments (iii) (M)	
NH ₄ Cl	$6,72 \times 10^{-3}$	HBO ₃	$1,90 \times 10^{-4}$
CaCl ₂ •2H ₂ O	$3,40 \times 10^{-4}$	ZnSO ₄ •7H ₂ O	$7,60 \times 10^{-5}$
MgSO ₄ •7H ₂ O	$4,06 \times 10^{-4}$	MnCl ₂ •4H ₂ O	$2,50 \times 10^{-5}$
K ₂ HPO ₄	$5,75 \times 10^{-4}$	FeSO ₄ •7H ₂ O	$1,80 \times 10^{-5}$
KH ₂ PO ₄	$4,05 \times 10^{-4}$	CoCl ₂ •6H ₂ O	$6,67 \times 10^{-6}$
TRIS	$2,00 \times 10^{-2}$	CuSO ₄ •5H ₂ O	$6,29 \times 10^{-6}$
CH ₃ COOH	$1,72 \times 10^{-2}$	(NH ₄)Mo ₇ O ₂₄ •4H ₂ O	$8,90 \times 10^{-6}$
		Na ₂ EDTA	$1,30 \times 10^{-4}$

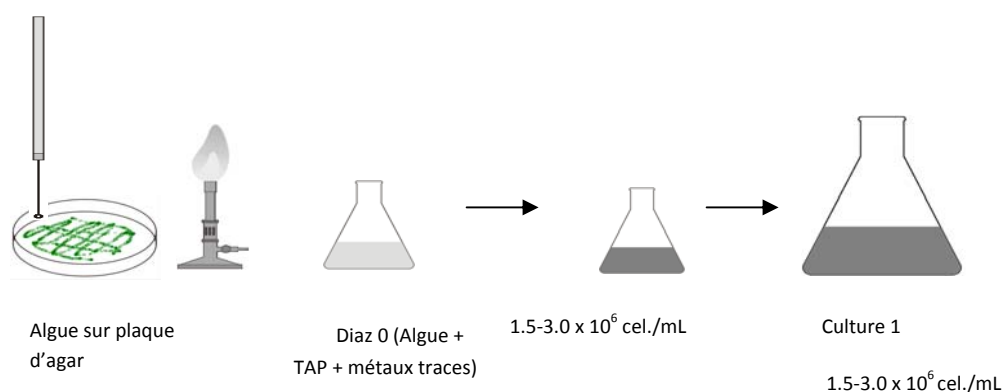


Figure 3 : Étapes de la culture des algues *Chlamydomonas reinhardtii* [65].

La culture résultante de l'application du protocole ci-dessus a été centrifugée à 2150 x g (Multifuge 1SR, Heraeus) pendant 4 minutes. Par la suite, les culots d'algues ont été rincés deux fois avec une solution TAP sans traces métaux (TAP-MT). Les parties inférieures résultantes de la centrifugation ont été mises en solution avec un volume final de 50 mL de TAP-MT. Finalement, la surface

cellulaire des algues de la solution concentrée résultante a été mesurée avec le compteur de particules (Multisizer 3, Beckman Coulter).

4.2-Évaluation de la bioaccumulation du Cd par *C. reinhardtii*:

Pour donner suite aux étapes de la culture, une quantité de la solution concentrée d'algues a été transférée dans les solutions d'exposition afin d'obtenir une densité de surface de $1 \text{ cm}^2/\text{mL}$. Les solutions d'exposition, préalablement stérilisées par autoclave, contenaient du Cd et du TAP-MT. Les ions Cd^{2+} sont tamponnés par le citrate à $0,01 \text{ M}$ (pH de 7,0). Les concentrations de Cd des différentes solutions d'expositions étaient de 0 M (contrôle), de $1,0 \times 10^{-7} \text{ M}$, de $5,0 \times 10^{-7} \text{ M}$ et de $1,0 \times 10^{-6} \text{ M}$. Ces solutions ont été préparées à partir d'une solution mère de Cd ($8,90 \times 10^{-3} \text{ M}$ dans 2% v/v d'acide nitrique, standard de Cd pour SAA, Fluka Analytical). Les solutions ont été préparées au moins 24 heures avant l'exposition des algues pour que l'équilibre chimique soit atteint.

Des prélèvements, en duplicata, des algues exposées au Cd ont été faits à 1, 2, 4, 6, et 8 heures. Un volume de 45 mL de la solution d'exposition des algues a été prélevé. Puis, 5 mL d'une solution de $0,001 \text{ M}$ EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate*, grade SigmaUltra, Sigma-Aldrich) a été ajouté pour arrêter la bioaccumulation c'est-à-dire que l'ion Cd (Cd^{2+}), contenu dans la solution d'exposition et adsorbé à la surface de l'algue, complexe avec l'EDTA [66]. Cette solution a été filtrée avec l'unité de filtration équipée d'un filtre MF-Millipore, $3,0 \mu\text{m}$. Les bords de l'ensemble de filtration ainsi que le filtre ont été rincés de l'EDTA avec un volume de 10 mL de TAP-MT. Le filtre a été digéré avec l'acide nitrique 65% (Ultrapure, Sigma-Aldrich) à une température de $80 \text{ }^\circ\text{C}$ (four VWR, model 1324). Finalement, de l'eau Milli-Q a été ajoutée à la suite de la digestion pour obtenir une solution contenant $1,95 \%$ (v/v) d'acide nitrique.

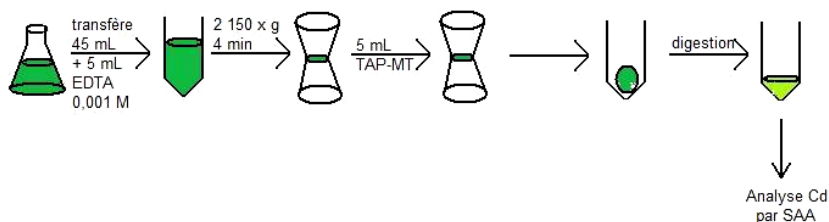


Figure 4 : Étapes de l'analyse du Cd internalisé dans les algues par suite à l'exposition au Cd.

L'analyse du Cd internalisé dans les algues a été réalisée par spectrométrie d'absorption atomique à four graphite (Zeeman atomic absorption spectrometer, graphite tube atomiser AA240Z/GTA120 de Varian inc.). Les paramètres d'analyse sont donnés dans le tableau II. Ils proviennent du manuel de référence de l'appareil [67] et seul le pourcentage d'acide dans la matrice a été modifié. À quelques reprises, les résultats aberrants ont été éliminés par l'application du test Q selon un niveau de confiance de 95 %.

Tableau II : Paramètres du spectromètre d'absorption atomique à four graphite

Élément :		Cd		
Matrice :		1,95% v/v acide nitrique ultrapure 65% (Sigma-Aldrich)		
Courant de la lampe :		4 mA		
Longueur d'onde :		228,8 nm		
Largeur de la bande passante :		0,5 nm		
Gaz :		Argon		
Conditions d'opération du four				
No. Étape	Température (°C)	Temps (sec.)	Débit du gaz (L/min.)	Lecture
1	85	5	3,0	Non
2	95	40	3,0	Non
3	120	10	3,0	Non
4	250	5	3,0	Non
5	250	1	3,0	Non
6	250	2	0	Non
7	1800	0,8	0	Oui
8	1800	2	0	Oui
9	1800	2	3,0	Non

Il est à noter que l'analyse du Cd a aussi été accomplie au même moment sur un blanc contenant le filtre uniquement, un blanc contenant des algues non exposées au Cd sur un filtre et un échantillon de plancton de référence certifié (BCR-414) par l'IRMM (*Institute for Reference Materials and Measurements*). La concentration en Cd de cet échantillon de référence est de $0,383 \pm 0,014$ mg/kg sur une masse sèche. Sauf en cas de contamination en métaux, les différents blancs ne contenaient pas de Cd.

4.3-Extraction des phytochélatines des algues :

Le même protocole que celui de la bioaccumulation du Cd dans les algues a été appliqué excepté qu'un volume de 60 mL de la solution a été prélevé au lieu de 45 mL. Pour faire suite à l'ajout de la solution d'EDTA, les tubes sont centrifugés pendant 4 minutes à 2150 x g. Le surnageant est retiré, le culot a été lavé avec la solution TAP-MT et recentrifugé sous les mêmes conditions. Le résidu d'algues tapi au fond qui a été obtenu a été mélangé (Digital vortex mixer, 3000 rpm, Fisher Scientific) et transféré dans un microtube. Le tube à centrifuger a été rincé avec de la solution TAP-MT et la solution de rinçage a été combinée à l'autre solution contenue dans le microtube. Par la suite, l'échantillon a été centrifugé à 10390 x g pendant 5 minutes (AccuSpin Micro R, Fisher Scientific). Finalement, le surnageant a été retiré de le microtube et il a été placé dans un congélateur (-80 °C) jusqu'à l'extraction des phytochélatines.

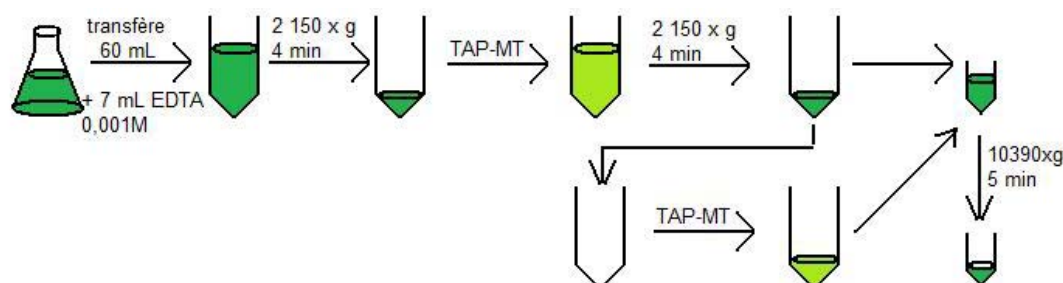


Figure 5 : Collecte des algues à la suite de l'exposition au Cd.

Le microtube contenant les algues exposées au Cd a été décongelé entre les doigts. Ensuite, une petite quantité de billes de verre a été placée avec 1,0 mL de la solution fraîche de 25 mM DTT (4°C, Sigma-Aldrich) dans le microtube. La bille de verre aide la sonication pour briser la membrane cellulaire de l'algue et, ainsi, extraire des phytochélatines. La solution de DTT avec les billes de verre a été mélangé (Digital vortex mixer, 3000 rpm, Fisher Scientific) pendant 1 minute suivie de 2 minutes de sonication (Branson 5510) dans une eau fraîche (additionnée d'un bloc réfrigérant) et de centrifugation à 10390 x g pendant 20 minutes à 4°C (AccuSpin Micro R, Fisher Scientific). Le surnageant résultant a été retiré et placé dans un tube microtube de 1,5 mL.

Le même processus à partir de l'ajout de 1,0 mL de 25 mM DTT a été répété deux fois. La solution résultante a été purifiée selon le protocole, voir ci-dessus, a été lyophilisée (Freezemobile 35 LE, VirTis) et a été congelée à -80 °C jusqu'à l'analyse des phytochélatines.

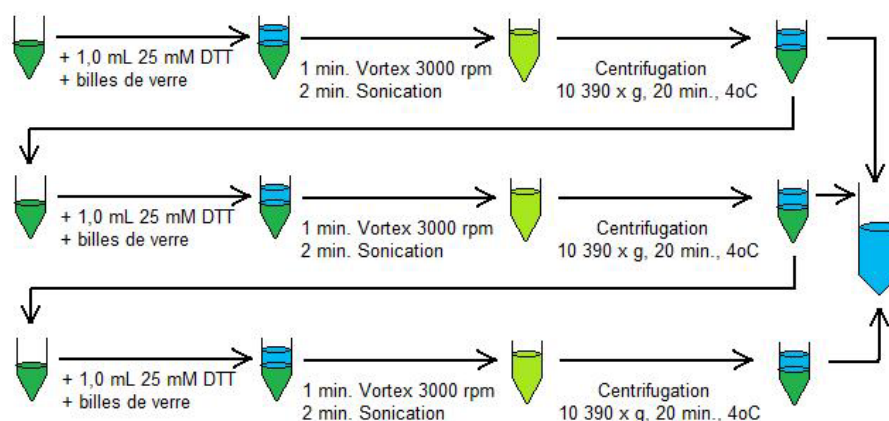


Figure 6 : Étapes de l'extraction des phytochélatines des algues.

4.4- Dosage des phytochélatines (PC2, PC3 et PC4) :

4.4.1 Développement de la méthode de séparation et de détection des phytochélatines (PC2, PC3 et PC4) par CLHP-IEN-SM/SM:

Les phytochélatines (Anaspec) ayant une pureté supérieure à 95 % ont été solubilisés dans l'eau Milli-Q à des concentrations de 1,0 mg/L pour chaque analyte (1,9 µM PC2, 1,3 µM PC3 et 1,0 µM PC4). Le mélange de PC a été injecté par infusion directe. Les spectres MS et MS/MS ont été visualisés par le logiciel Xcalibur (Thermo Fisher Scientific). Les ions de fragmentation et leur énergie de collision optimale ont été déterminés. L'appareil utilisé est un spectromètre de masse quadripôle TSQ Quantum Ultra AM de Thermo Fisher Scientific doté de la source par électronébulisation.

Pour les séparations, le spectromètre de masse quadripôle TSQ Quantum Ultra AM de Thermo Fisher Scientific a été couplé à un CLHP (ThermoFinnigan Surveyor HPLC system). Les analytes ont été séparées par la chromatographie en phase inverse. Les paramètres chromatographiques et de détection sont inscrits dans le Tableau III.

Tableau III : Paramètres chromatographiques et de détection des phytochélates par CLHP-SM/SM.

CLHP			MS		
Colonne	Eclipse XDB-C18		Source d'ionisation	IEN	
Débit	500 µL/min.		Analyseur	Triple quadripôle	
Volume injecté	3 µL		Mode	MRS	Positif
Solvants	A : H ₂ O 0,1% acide formique			Ion Parent (m/z)	Ion produit (m/z)
	B : Acétonitrile 0,1% acide formique			540,200	336,100
Gradients	Minutes	Solvant A			411,200
	0,00-10,00	95,0 %		772,200	
	10,00-11,00	50,0 %			465,100
	11,00-13,00	10,0 %		1004,300	
	13,00-13,10	10,0 %			697,100
	13,10-18,00	95,0 %			
			Mode	Full scan (m/z)	
				100,000-1100,000	

Par la suite, la *réplicabilité analytique* de deux colonnes, soit l'Eclipse XDB-C18 (5,0 µm, 4,6 x 150 mm, Agilent) et la Jupiter Proteo (4 µm, 4,6 x 250 mm, Phenomenex), a été comparée. Elle est analysée par six fois l'injection de 3 µL de la solution des standards des phytochélates PC2, PC3 et PC4 à une concentration de 1,0 mg/L dans l'eau Milli-Q.

D'autre part, l'*effet mémoire (carry-over)* a été évalué sur les mêmes colonnes. Il est calculé par le pourcentage de l'aire du phytochélate dans le blanc, qui suit le standard, sur l'aire du phytochélate dans le standard. La même solution des standards de phytochélates a été injectée selon les mêmes paramètres que ci-dessus suivi de l'injection de deux blancs et ceci a été répété six fois.

Finalement, la phase mobile a été optimisée. En réponse à des difficultés à se procurer l'acétonitrile, la phase mobile 0,1% d'acide formique (90% v/v, J.T. Baker) dans l'acétonitrile (grade CLHP et SM J.T. Baker) a été changé pour celle contenant 0,1% d'acide formique dans le méthanol (grade CLHP et SM, J.T. Baker). Une série de 10 injections de la même solution des standards de phytochélates a été réalisée selon les paramètres du tableau III excepté le changement de la phase mobile.

4.4.1.1-Purification de l'extrait des algues à la suite de l'application du protocole d'extraction :

Lors de l'utilisation du protocole d'extraction des algues, la solution obtenue était chargée de composés en suspension. La détection par spectromètre de masse exige une solution d'analyse exempte de particules complexes afin d'optimiser la sensibilité de la détection, de maintenir le bon fonctionnement et de garantir les résultats de l'instrument. Ainsi, diverses techniques de purification : l'extraction liquide solide, la chromatographie d'affinité d'ions métalliques immobilisés et la centrifugation ont été expérimentées. Par la suite, les purifications ont été validées par l'analyse de la présence de phytochélatines (PC2, PC3 et PC4) par CLHP-MS/MS selon le protocole établi.

Extraction liquide solide (EPS) :

En résumé, deux cartouches Oasis MAX, 60 mg de Waters ont été équilibrées avec 1,0 mL de 90 % (v/v) de méthanol. Ensuite, la solution témoin résultant de l'application du protocole d'extraction des phytochélatines a été additionnée du standard des phytochélatines (PC2, PC3 et PC4) et elle a été chargée sur une des cartouches. La concentration de chaque phytochélatine est de 1,0 mg/L. Sur la seconde cartouche, seule la solution provenant du même protocole et non enrichie a été chargée.

Un premier lavage de la cartouche a été fait avec 1,0 mL de 5 % (m/v) bicarbonate d'ammonium (Sigma-Aldrich) et un second avec 1,0 mL de méthanol (J.T. Baker). Finalement, l'élution de l'analyte dépend du pourcentage de méthanol dans la solution. Ainsi, 1,0 mL d'une solution où la concentration en méthanol varie (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 et 100%) dans 2% v/v d'acide formique (90 %, J.T. Baker) a été utilisé pour l'élution des cartouches. Le pH de ces solutions varie entre 2,23 et 2,61. Le débit d'écoulement de toutes les solutions sur les cartouches a été réglé à 1 mL/min par centrifugation (Multifuge 1SR, Heraeus).

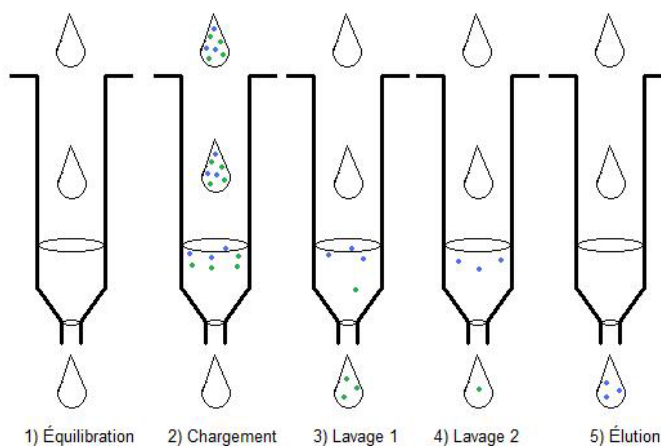


Figure 7: Étapes pour la purification par l'extraction liquide solide (EPS).

Chromatographie d'affinité d'ion métallique immobilisé (traduction de immobilized-metal affinity chromatography) :

Un protocole similaire au précédent a été appliqué sur les cartouches NTA Superflow 1 mL de Qiagen (voir figure 8). Dans un premier temps, la cartouche a été lavée avec 10 mL d'eau Milli-Q. À la suite de l'équilibration, 10 mL d'une solution de Cd de 100 mM (Sigma-Aldrich) ont été passés à travers la cartouche afin que le Cd se lie à la phase stationnaire dans le but d'être sélectif aux phytochélatines. Ensuite, le Cd non lié à la phase stationnaire a été rincé de la cartouche avec 10 mL d'eau Milli-Q. Les cartouches ont été chargées selon le même mode opératoire que lors de l'extraction liquide-solide. Puis, 10 mL de chaque solution de DTT de 25 mM ayant un pH de 6 (6,0), 5 (5,0), 4 (4,4), 3 (3,0) et 2 (2,1) sont passés, respectivement, à travers les cartouches. Les différentes phases ont été analysées conformément au protocole précédent. Le débit du passage de toutes les solutions sur les cartouches été de 1 mL/min

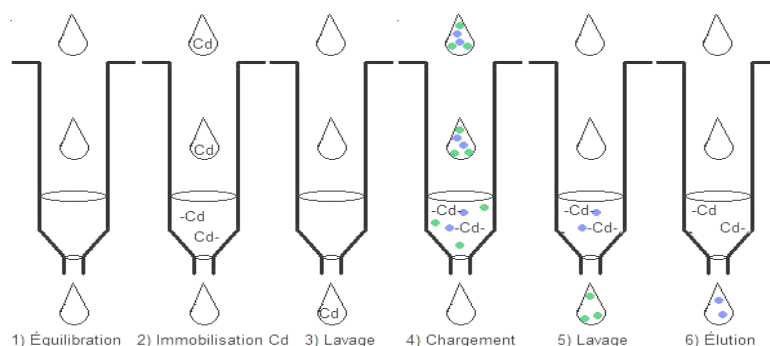


Figure 8 : Étapes pour la purification par la chromatographie d'affinité d'ion métallique immobilisé.

Centrifugation :

La séparation de solides en suspension dans une solution est possible en utilisant la centrifugeuse. Différentes forces centrifuges (g) ont été testées pour séparer les débris cellulaires des phytochélatines dans la solution d'extraction (voir la figure 9). Une comparaison visuelle de l'opacité de la solution résultante de l'extraction des phytochélatines non purifiée entre les solutions centrifugées à diverses forces centrifuges. Il est à noter que rpm est une valeur nominale de l'instrument. Ces forces sont de 11 320xg (12481 rpm), 12320 x g (13021 rpm), 13320 x g (13539 rpm), 14320 x g (14038 rpm), 15320 x g (14520 rpm) et 16320 x g (14986 rpm) (Multifuge 1SR, Heraeus).

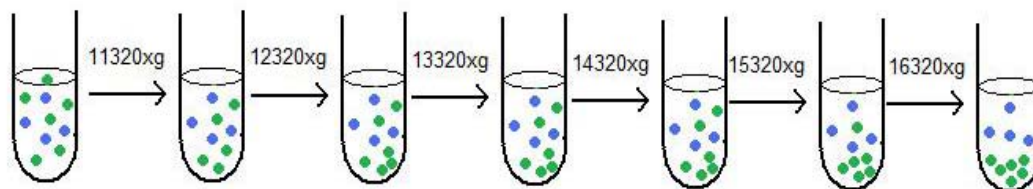


Figure 9 : Étapes pour la purification par centrifugation.

4.4.2 Dosage des phytochélatines (PC2, PC3 et PC4) par CLHP détection fluorescence :

Cette partie a été réalisée en collaboration avec Madame Pauline Abboud (stagiaire). Les phytochélatines (PC2, PC3 et PC4) ont aussi été analysés par HPLC avec un détecteur de fluorescence. Les phytochélatines ont été séparés après que leurs groupements thiol eurent été dérivés avec le fluorophore

monobromobimane en suivant la procédure indiquée par Morelli E. et Scarano G. [68] avec quelques modifications. La détection des phytochélatines dérivées se fait à une longueur d'onde d'excitation de 380 nm et à une longueur d'onde d'émission de 470 nm. Tous les produits nécessaires pour accomplir la réaction de dérivation proviennent de la compagnie Sigma-Aldrich.

En bref, le protocole de l'extraction des phytochélatines a été appliqué jusqu'à la lyophilisation. Par la suite, 200 μL d'une solution de 0,12M HCl/ 5 mM *diethylenetriaminepentaacetic acid* (DTPA) ont été combinés aux algues lyophilisées. La solution a été mélangée pendant 2 minutes et centrifugée à 10390 x g pendant 5 minutes (AccuSpin Micro R, Fisher Scientifique). À 50 μL du surnagent, 130 μL d'une solution composée de 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinepropanesulfonic acid (EPPS) de 0,1M et de DTPA de 2,5 mM où le pH est de 8,3 ont été ajoutés. Puis, 10 μL de *tris(2-carboxyethyl)phosphine* (TCEP) de 10 mM ont été ajoutés à la solution ci-dessus. La réaction a eu lieu dans l'obscurité pendant 20 minutes. Puis, 20 μL de l'agent dérivant, le *monobromobimane* de 10 mM dans l'acétonitrile, ont été ajoutés à cette solution et un temps de réaction de 10 minutes, à l'abri de la lumière, a été appliqué. La réaction de dérivation a eu lieu dans l'obscurité. 20 μL de cystéine de 0,1 M ont été ajoutés suivi de 10 minutes d'attente supplémentaire toujours à l'obscurité pour réduire les pics d'interférences lors de la détection. Finalement, 20 μL de *methanesulfonic acid* (MSA) de 1 M ont été joint à la solution pour arrêter la réaction de dérivation.

4.5-Validation de la méthode analytique :

L'évaluation de la spécificité consiste à démontrer que seul l'analyte est détecté et qu'il n'y a pas d'interférence avec d'autre composé présent dans la matrice. Pour se faire, la détermination des phytochélatines d'échantillon de la matrice seule et d'échantillons de la matrice avec ajouts dosés a été faite. Dans ce cas-ci, la matrice est l'extrait obtenu à la suite de la procédure d'extraction des phytochélatines sur des algues non exposées aux métaux et la concentration des ajouts était de 300 $\mu\text{g/L}$ de phytochélatines.

La répétabilité a été estimée en appliquant la méthode analytique dix fois sur un échantillon où la concentration se situe dans la zone de quantification, 300 $\mu\text{g/L}$ de phytochélatines, et que toutes les étapes de la méthode d'analyse ont été

appliquées le même jour, avec le même analyste et le même appareil. Le domaine de linéarité de la méthode d'analyse est obtenu à la suite de l'application de la méthode d'analyse sur un échantillon d'algues non exposé au Cd et dopé par au moins 5 concentrations différentes des standards de phytochélatines et répété au moins 3 fois. Tandis que le domaine de linéarité de l'instrument est obtenu par le même principe, mais sur les standards de phytochélatines en solution sans la matrice. Pour ce faire, une série de dilution de la solution mère (100,0 mg/L) dans l'eau Milli-Q a été préparée afin de couvrir une gamme de concentration allant de 1 µg/L jusqu'à 1,0 mg/L et analysée. Par la suite, la LDI, la LQI, la LDM et la LQM ont été déterminées.

Finalement, la validation a été complétée par une étude de la stabilité des phytochélatines. L'étude de la stabilité du composé est une étape primordiale lors de la validation de la méthode analytique puisqu'elle garantit la qualité de l'analyte quantifiée, donc des résultats de l'analyse en soi. Ainsi, la dégradation de la substance au cours du temps sera évaluée. Elle sera exprimée sous forme de signal obtenu d'un blanc où une certaine concentration de l'analyte est ajoutée en fonction du temps de l'étude.

4.6- Expérience en milieu naturel :

Le protocole de l'inoculation et de l'isolation de *C. reinhardtii* a été appliqué. Par la suite, une quantité de la solution concentrée d'algues a été transférée dans l'eau de la rivière Riou Mort et celle de la rivière Bouillac, filtrée préalablement avec un filtre ayant une porosité de 0,45 µm (Milipore) suivi d'un autre de 0,22 µm (Millipore), afin d'obtenir une densité de surface de 1 cm²/mL. À l'inverse de la rivière Riou Mort, la concentration de Cd dans la rivière Bouillac est relativement faible, ce qui permet de considérer cette rivière comme étant la rivière de contrôle. Cette solution a été ajoutée à un dispositif, le SUBS (*Stirred Underwater Biouptake System*) (Figure 10, [69]), et il a été inséré dans un bassin contenant de l'eau naturelle pour la durée de l'exposition (1h, 2h, 4h et 6h). Le bassin est un récipient utilisé lors de l'aménagement d'un jardin d'eau et l'échange continu d'eau provenant de la rivière a été assuré par une pompe rotative telle qu'utilisée pour vider la cale d'un bateau (Figure 11). Ensuite, le SUBS a été retiré et 60 mL de la solution ont été prélevés en duplicata. Le protocole de l'extraction des phytochélatines a été

appliqué jusqu'à l'étape de la congélation. Les échantillons ont été gardés dans la glace sèche lors de leur transport vers Montréal puis à une température de -80°C jusqu'au moment de l'application du protocole d'extraction. Finalement, les échantillons ont été analysés au CLHP-IEN-MS/MS comme indiqué dans le protocole précédent.

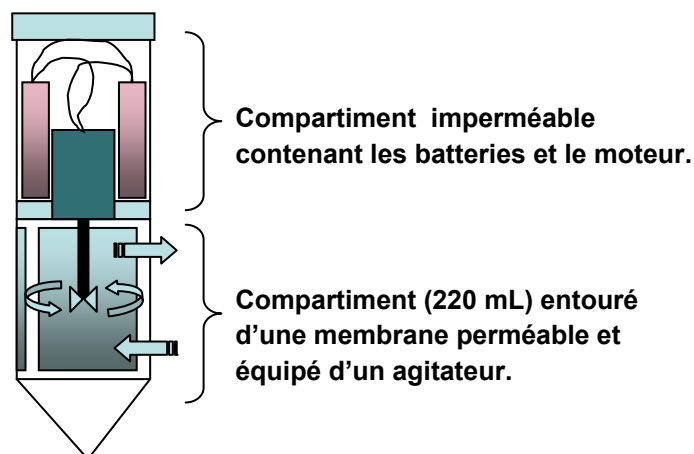


Figure 10: Schéma du SUBS (*Stirred Underwater Biouptake System*) [69].



Figure 11: Bassin naturel de la rivière Riou Mort.

5-RÉSULTATS ET DISCUSSION :

5.1-Développement de la méthode chromatographique :

La première étape de la conception de la méthode de séparation et de détection par le CLHP-SM/SM est de procéder par l'infusion d'une solution concentrée en analyte d'intérêt dans le spectromètre de masse. Ceci est indispensable afin de valider la présence des ions précurseurs des analytes puis de déterminer les ions fragments dans le cas d'une détection par tandem. Ainsi, ce procédé a été réalisé sur un mélange des trois phytochelatines certifiés à des concentrations de 1,0 mg/L. Les paramètres chromatographiques et de détection sont inscrits dans le tableau III (section méthodologie) et les chromatogrammes obtenus sont présentés à la Figure 12.

Le champ de détection a été réduit aux PC2 (m/z de 540.6), PC3 (m/z de 772.9) et PC4 (m/z de 1005.1). Les analyseurs triple quadripôle ont une limite supérieure égale à un ratio masse molaire sur la charge de la molécule (m/z) de 1500 [70]. Ainsi, il aurait été possible d'analyser le PC5 (m/z de 1236.4) et le PC6 (m/z de 1468.6). Dans le cadre de cette étude, la limitation au PC2 jusqu'au PC4 est attribuée au coût des standards de références qui est extrêmement onéreux. En guise d'exemple, le coût de 1 mg du PC4 par la compagnie Anaspec est de 140 \$ US [71].

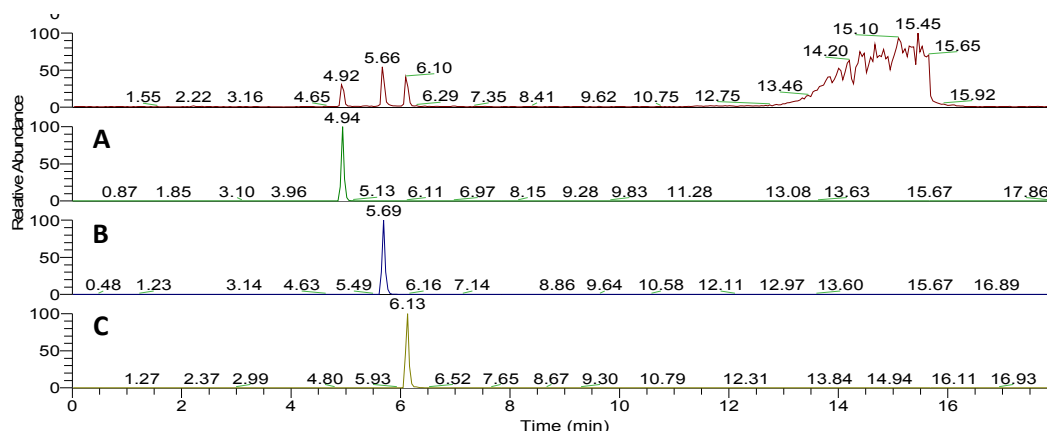


Figure 12 : Chromatogrammes de la séparation et de la détection, par le CLHP-IEN-SM/SM avec la colonne Eclipse XDB-C18, de 3 μ L de la solution des standards des phytochélatines. Cette solution comprend le PC2 (A), le PC3 (B) et le PC4 (C). La concentration de chaque analyte est de 1,0 mg/L dissous dans l'eau Milli-Q.

Les chromatogrammes sont composés de 4 parties. La première représente le mode «full scan» qui balai une gamme de masse/charge allant de 100 à 1100. Les trois autres représentent l'ion produit par le PC2 (A), le PC3 (B) et le PC4 (C) au spectromètre de masse en tandem c'est-à-dire que l'ion parent est sélectionné par le premier analyseur puis, il est fragmenté dans la cellule à collision et le second analyseur focalise sur l'ion produit. Ainsi, le chromatogramme présente 3 pics fins et distincts plus un large pic en fin de programme. Il est possible d'assigner les différents pics au phytochélatine correspondant en fonction du rapport m/z. En somme, la première composante qui a été séparée est le PC2, temps de rétention de 4,94 min., suivi par le PC3, temps de rétention de 5,69 min., et finalement le PC4, temps de rétention de 6,13 min. Le pic en fin de chromatogramme ne correspond pas aux phytochélatines. Comme les standards utilisés ont une pureté supérieure à 95 %, ce pic provient des composants de la synthèse des phytochélatines. En aucun cas, ceci n'influe pas sur la séparation et la détection des analytes.

L'ordre d'élution des composés de la solution s'explique par la nature des composés. Dans le cas présent (chromatographie en phase inverse), la séparation est effectuée à partir de la molécule la plus polaire, PC2, à celle-là moins polaire, PC4. La structure générale des phytochélatines a été décrite et présenté à la figure 1 dans la section introduction de ce mémoire. De façon intelligible, il a été montré

par l'injection des phytochélatines certifiés qu'ils sont détectables et identifiables par le CLHP-SM/SM.

5.2-Maximisation des paramètres de la méthode chromatographique :

Plusieurs paramètres peuvent influencer la réponse instrumentale. Le réglage de ces facteurs doit être fait afin de maximiser cette réponse et, ainsi, diminuer l'erreur. La mise au point des paramètres chromatographiques résulte de l'observation de la réponse instrumentale lors d'un changement à une variable. Dans ce contexte, le rôle de la colonne et la phase mobile ont été étudiés. La répétabilité analytique, voir section théorie, a été calculé sur 6 injections, effectuées le même jour, d'une solution des standards des phytochélatines solubilisés avec l'eau (Tableau IV). Sur la base d'une comparaison de la répétabilité analytique des injections, celle résultante avec la colonne Eclipse XDB est supérieure à celle de la colonne Proteo. De plus, la séparation des phytochélatines obtenues avec la colonne Proteo n'est pas satisfaisante en ce qui concerne l'aspect du pic puisqu'ils sont évasés et échevelés (Figure 13). Il est à remarquer aussi que les temps de rétention des divers composés séparés par la colonne Proteo ont été plus longs comparativement à ceux de l'Eclipse XDB.

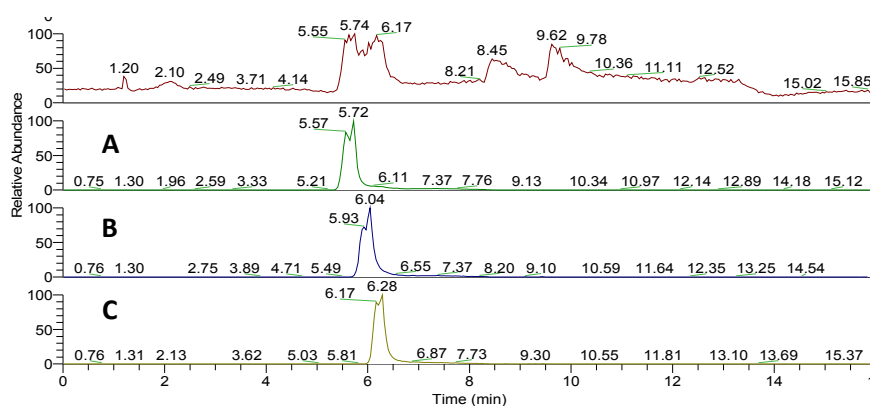


Figure 13 : Chromatogrammes de la séparation et de la détection, par le CLHP-IEN-SM/SM, de 3 μ L de la solution des standards des phytochélatines. Cette solution comprend le PC2 (A), le PC3 (B) et le PC4 (C). La concentration de chaque analyte est de 1,0 mg/L dissous dans l'eau Milli-Q.

Tableau IV : Répétabilité analytique de l'injection de 3 µL de la solution des standards des phytochélates au CLHP-IEN-SM/SM avec la colonne Eclipse XDB et la colonne Jupiter Proteo. Cette solution comprend le PC2, le PC3 et le PC4 à une concentration de 1,0 mg/L dans l'eau Milli-Q.

Colonne	Eclipse			Jupiter Proteo		
	Aire (u.a.)			Aire (u.a.)		
Essai	PC2	PC3	PC4	PC2	PC3	PC4
1	18 x 10 ⁶	2,1 x 10 ⁶	3,1 x 10 ⁵	18 x 10 ⁶	2,1 x 10 ⁶	10 x 10 ⁵
2	22 x 10 ⁶	2,5 x 10 ⁶	3,8 x 10 ⁵	12 x 10 ⁶	1,5 x 10 ⁶	8,9 x 10 ⁵
3	18 x 10 ⁶	2,4 x 10 ⁶	3,7 x 10 ⁵	28 x 10 ⁶	2,5 x 10 ⁶	9,5 x 10 ⁵
4	22 x 10 ⁶	2,5 x 10 ⁶	3,9 x 10 ⁵	15 x 10 ⁶	1,9 x 10 ⁶	9,5 x 10 ⁵
5	22 x 10 ⁶	3,2 x 10 ⁶	5,0 x 10 ⁵	29 x 10 ⁶	3,7 x 10 ⁶	12 x 10 ⁵
6	25 x 10 ⁶	2,7 x 10 ⁶	4,1 x 10 ⁵	28 x 10 ⁶	3,4 x 10 ⁶	11 x 10 ⁵
Moyenne	21 x 10 ⁶	2,6 x 10 ⁶	3,9 x 10 ⁵	22 x 10 ⁶	2,5 x 10 ⁶	8,6 x 10 ⁵
Écart-type	2,5 x 10 ⁶	0,4 x 10 ⁶	0,6 x 10 ⁵	7,5 x 10 ⁶	0,9 x 10 ⁶	3,9 x 10 ⁵
Répétabilité	2,7 x 10 ⁶	3,7 x 10 ⁵	6,5 x 10 ⁴	7,9 x 10 ⁶	9,1 x 10 ⁵	4,1 x 10 ⁵

Il est possible que les phytochélates accrochées à la phase stationnaire ne soient pas tous larguées pendant l'analyse. L'effet mémoire de la phytochélatine sur la colonne est exprimé par le pourcentage du ratio de l'aire de la phytochélatine dans le blanc, qui suit le standard, sur l'aire de la phytochélatine dans le standard. Dans ce cas-ci, l'effet mémoire est attribuable seulement à la colonne puisqu'il n'a été observé pour le reste de l'appareil. En effet, la même démarche scientifique a été réalisée excepter que la colonne a été retirée et remplacée par un raccord. Ainsi, l'effet mémoire de la colonne Eclipse XDB (Tableau V) et celle de la Proteo (Tableau VI) est faible. Par contre, l'effet observé est légèrement plus important avec la colonne Proteo. En raison des résultats de répétabilité et d'effet mémoire, la colonne Eclipse XDB a été choisie.

Tableau V : Effet mémoire suite à l'injection de 3 μ L de la solution des standards des phytochélates au CLHP-IEN-SM/SM avec la colonne Eclipse XDB. Cette solution comprend le PC2, le PC3 et le PC4 à une concentration de 1,0 mg/L dans l'eau Milli-Q.

Aire PC2			Aire PC3			Aire PC4		
Standard	Blanc	Effet mémoire (%)	Standard	Blanc	Effet mémoire (%)	Standard	Blanc	Effet mémoire (%)
32235833,33	ND	ND	4880069,97	2270,75	0,05	1014735,05	1887,27	0,19
	ND	ND		173,88	0,00		33,54	0,00
21038821,95	ND	ND	3359626,54	1163,69	0,03	616695,86	954,38	0,15
	ND	ND		307,73	0,01		219,05	0,04
27134535,76	4914,09	0,02	4528564,75	110,12	0,00	532149,85	448,91	0,08
	ND	ND		54,70	0,00		79,13	0,01
32448120,54	ND	ND	4863180,37	3485,67	0,07	766688,86	3138,04	0,41
	ND	ND		1008,57	0,02		130,47	0,02
23339798,24	ND	ND	3725497,16	1869,25	0,05	815690,56	2083,42	0,26
	ND	ND		253,72	0,01		574,98	0,07
23930383,02	ND	ND	3935049,38	1302,32	0,03	541366,87	1770,04	0,33
	ND	ND		114,24	0,00		83,12	0,02

Tableau VI : Effet-mémoire suite à l'injection de 3 μ L de la solution des standards des phytochélates au CLHP-IEN-SM/SM avec la colonne Jupiter Proteo. Cette solution comprend le PC2, le PC3 et le PC4 à une concentration 1,0 mg/L.

Aire PC2			Aire PC3			Aire PC4		
Standard	Blanc	Effet mémoire (%)	Standard	Blanc	Effet mémoire (%)	Standard	Blanc	Effet mémoire (%)
18156057,93	ND	ND	2062589,06	ND	ND	1037356,93	1870,69	0,18
	ND	ND		ND	ND		ND	ND
11671586,91	ND	ND	1540465,56	1933,94	0,13	894107,23	771,58	0,09
	ND	ND		943,06	0,06		ND	ND
27598907,39	ND	ND	2516114,68	3766,12	0,15	948003,01	126,05	0,01
	ND	ND		218,13	0,01		ND	ND
14958439,38	15024,03	0,10	1853169,10	2075,16	0,11	94752,68	1012,35	1,07
	ND	ND		1651,84	0,09		ND	ND
28580556,95	ND	ND	3734808,37	3290,66	0,09	1151149,91	863,88	0,08
	ND	ND		680,39	0,02		ND	ND
28298174,57	ND	ND	3354528,60	2256,14	0,07	1052927,07	396,09	0,04
	ND	ND		ND	ND		ND	ND

Le second paramètre étudié était le choix de la phase mobile. L'interaction entre la phase mobile et la phase stationnaire se reflète sur le temps de rétention des analytes. La phase mobile qui a été choisie est le 0,1% d'acide formique dans l'acétonitrile. En spectrométrie de masse avec électronébulisation, le pourcentage

d'acide formique permet l'augmentation de l'ionisation des molécules. L'expérience a consisté à remplacer la phase mobile de 0,1% d'acide formique dans l'acétonitrile par celle de 0,1% d'acide formique dans le méthanol. Il était toujours possible de bien séparer les phytochélatines avec cette phase mobile (Figure 14), cependant, le temps d'élution des analytes a augmenté. Compte tenu des résultats obtenus lors de l'optimisation des paramètres de la méthode chromatographique, la colonne Eclipse XDB a été choisie pour le reste de cette étude. Par contre, l'acétonitrile, le solvant organique, qui a été utilisé la majorité du temps a été remplacé en fin d'études par le méthanol en raison de la crise due à un manque mondial d'acétonitrile.

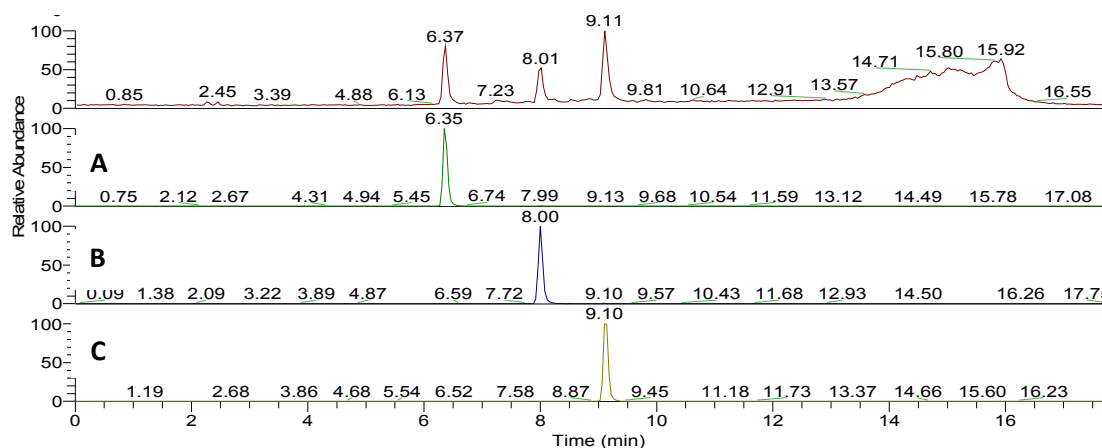


Figure 14 : Chromatogrammes de la séparation et de la détection, par le CLHP-IEN-SM/SM, de 3 μ L de la solution des standards des phytochélatines. Cette solution comprend le PC2 (A), le PC3 (B) et le PC4 (C) à une concentration de 1,0 mg/L dans l'eau Milli-Q. Il est à noter que la phase mobile de 0,1% d'acide formique dans l'acétonitrile a été remplacée par une solution de 0,1% d'acide formique dans le méthanol.

5.3-Comparaison de la méthode de détection par spectrométrie de masse avec celle par fluorescence :

La séparation des phytochélatines par CLHP et la détection par fluorescence ont été appliquées à une solution des standards des phytochélatines dissoutes dans 25 mM DTT ainsi qu'à celle d'une solution blanc (25 mM DTT). Les mêmes pics ont été présents dans les deux solutions (Figure 15) ce qui indique que ces pics sont les réactifs utilisés lors de la dérivation des thiols. Ainsi, ce résultat laisse croire que le DTT utilisé pour la réduction des phytochélatines, lors de l'extraction, a interféré avec la dérivation des thiols.

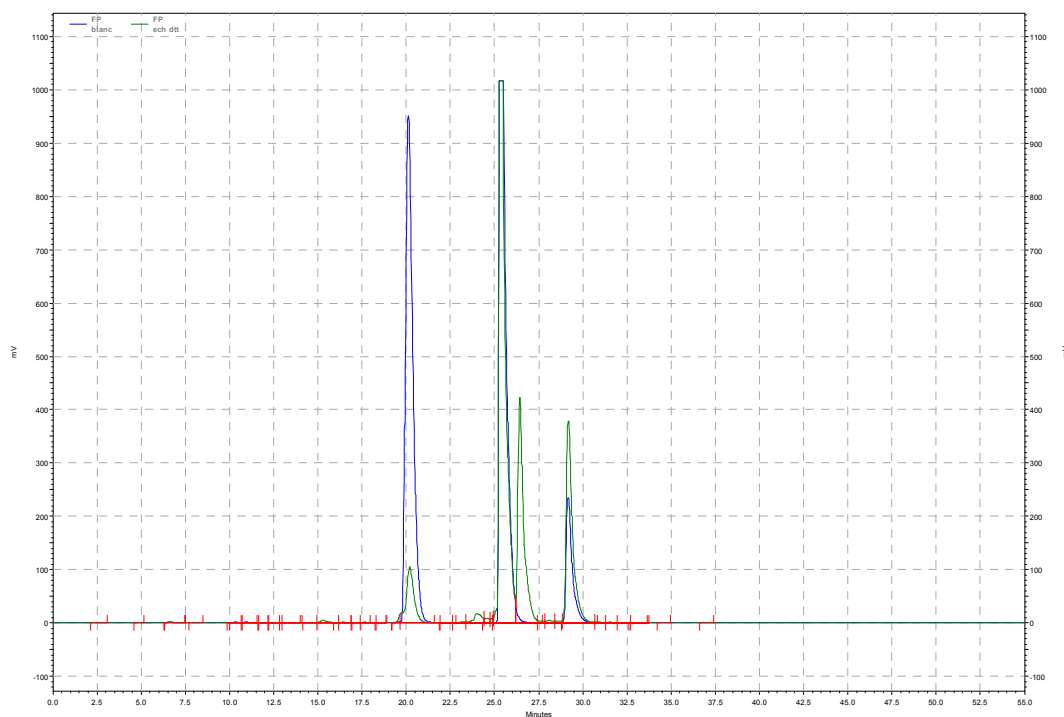


Figure 15 : Chromatogramme de la séparation et de la détection de 80 μ L de la solution blanc (bleu) et de 80 μ L des standards des phytochélatines (vert) a une concentration de 1,0 mg/L dissous dans 25 mM DTT effectuées au CLHP couplé à une détection par fluorescence.

Le même protocole a été appliqué à une quantité du standard de phytochélatines dissous dans l'eau au lieu dans le DTT. Le chromatogramme de la dérivation des phytochélatines comportait les mêmes pics que celui de la solution blanc. Ces pics sont des résidus réactionnels à la suite de l'application du protocole de la dérivation des thiols. Finalement, les trois pics supplémentaires présents dans cette même solution correspondent aux phytochélatines PC2, PC3 et PC4 (Figure 16).

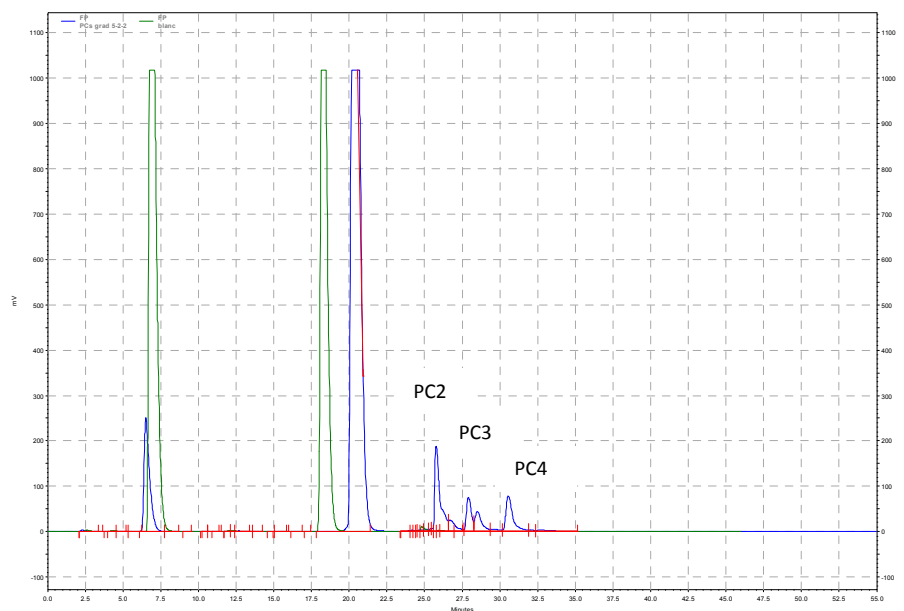


Figure 16 : Chromatogramme de la séparation et de la détection, au CLHP détection par fluorescence, de 80 μ L de la solution blanc (vert) et de 80 μ L des standards des phytochélatines (bleu) a une concentration de 1,0 mg/L dissous dans l'eau Milli-Q.

Par la suite, une étude comparative et préliminaire de la sensibilité de CLHP-IEN-SM/SM et de CLHP-fluorescence a été réalisée en mesurant l'aire des pics de PC2, PC3 et PC4 obtenus lors de l'injection d'une solution standard de 300 μ g/L. Aucun pic des analytes PC2, PC3 et PC4 dérivés n'a été détecté (Figure 17). Ceci a indiqué que la méthode de détection par dérivation du thiol semblait être moins sensible que celle par spectrométrie de masse. Cependant, seule une étude approfondie des limites de détections et des limites de quantifications pourrait le démontrer de façon claire.

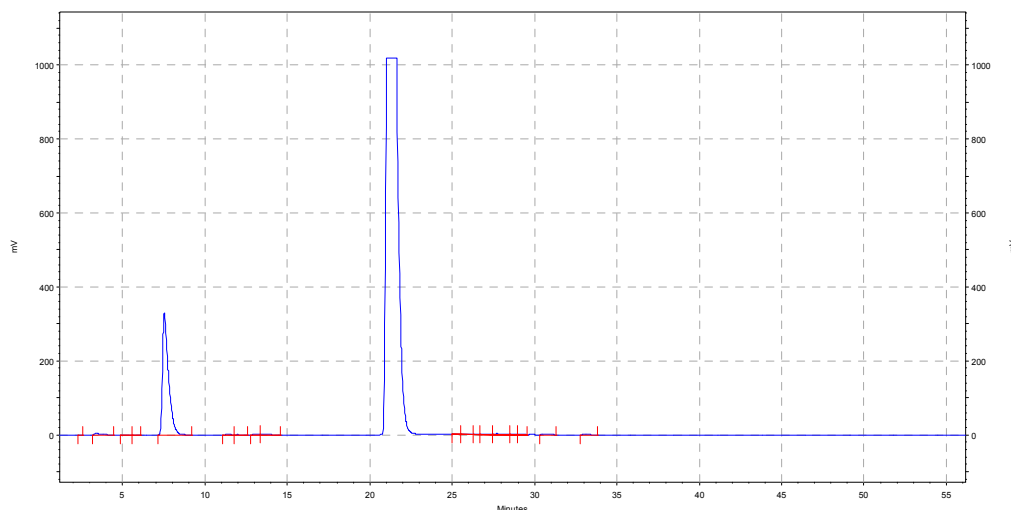


Figure 17 : Chromatogramme de la séparation et de la détection, par CLHP détection par fluorescence, de 10 μ L du standard des phytochélatines a une concentration de 300 μ g/L dissous dans l'eau Milli-Q.

5.4-Purification de la solution d'extraction des phytochélatines :

Le protocole d'extraction est constitué de 4 phases : cycle gel-dégel, réduction, vortex et sonication. Le cycle gel-dégel, le vortex et la sonication sont nécessaires pour briser la membrane cytoplasmique de l'algue et, ainsi, libérer les phytochélatines. Cette procédure conduit à l'obtention d'une solution qui renferme beaucoup de débris cellulaires. Il est nécessaire de retirer les débris cellulaires afin de ne pas endommager le spectromètre de masse et diminuer les interférences signal/bruit, ions supresseurs, lors de l'analyse.

En premier lieu, la filtration a été utilisée pour purifier la solution obtenue à la suite de l'application du protocole d'extraction des phytochélatines des algues. La filtration a été effectuée par un filtre en polyfluorure de vinylidène (PVDF) de Whatman ayant 0,22 μ m de diamètre de pores. À la suite de cette étape, la solution résultante présente toujours des débris cellulaires. Les photos suivantes démontrent la solution d'extraction avant et après la filtration :

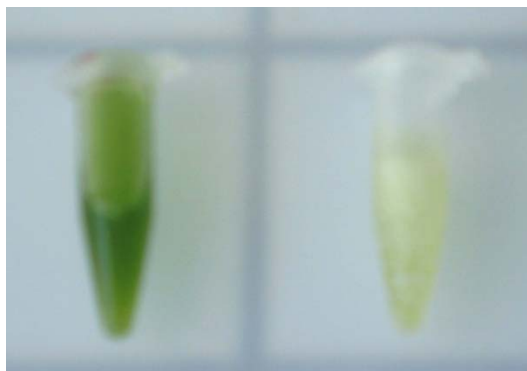


Figure 18 : La solution résultant de l'extraction des phytochélatines des algues (à gauche) et la même solution filtrée sur une porosité de 0,22 μm (PVDF, Whatman) (à droite).

Par la suite, l'extraction en phase solide (EPS) a été tenté avec une cartouche Oasis MAX de Waters. Les modes de séparation de la phase stationnaire sont la phase inverse et l'échange d'anions. En résumé, le mode opératoire consiste à conditionner la phase stationnaire, de charger les phytochélatines contenus dans la matrice dopée à 1,0 mg/L en phytochélatines ou celle de la solution de contrôle sur la cartouche, puis de laver la phase stationnaire des espèces non désirées et finalement d'éluer les phytochélatines. Chaque solution passée sur la cartouche a été analysée par la spectrométrie de masse en tandem, IEN-SM/SM, afin d'identifier les phytochélatines et de comparer la réponse à la solution standard. Ainsi, théoriquement, les phytochélatines devraient seulement être présents à la suite du passage de l'éluant sur la cartouche.

Expérimentalement, l'essai de l'extraction avec la cartouche Oasis MAX démontre que les phytochélatines ont été retenus par la phase stationnaire puisqu'aucun peptide n'a été retrouvé dans la solution après le chargement, figure 20. Dans le cas contraire, les chromatogrammes ressembleraient à ceux des solutions standards, figure 19. La solution après le chargement est la résultante du passage sur la membrane de la solution contenant la matrice avec l'ajout des standards de phytochélatines. De plus, une partie des phytochélatines ont été largués de la phase stationnaire lors du deuxième lavage avec le méthanol, figure 21, et une autre partie des phytochélatines a été larguée par chacune des solutions éluantes, figure 22 et figure 23. Ces dernières sont composées de 2 % v/v d'acide formique dans 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ou 100 % de méthanol). En plus, la présence de débris cellulaires a été constatée, visuellement, par suite au passage des

solutions concentrées en méthanol. Finalement, ce protocole d'extraction solide liquide n'a pas fonctionné pour purifier la solution puisque des débris sont encore présents avec les phytochélatines et l'élution de ces derniers n'est pas maîtrisée parce que les phytochélatines se retrouvent dans deux phases au lieu d'une seule.

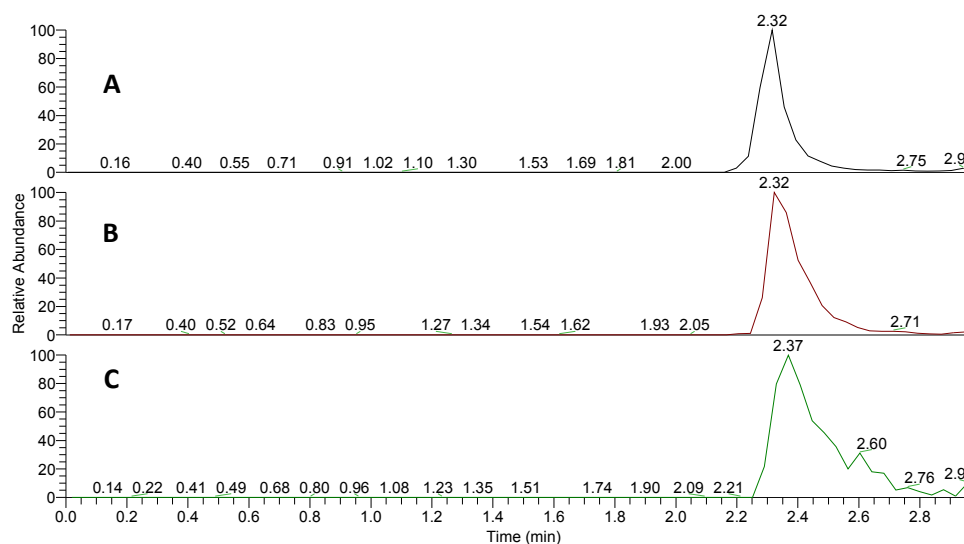


Figure 19 : Chromatogrammes de l'injection de 10 µL de la solution des standards des phytochélatines au IEN-SM/SM. Cette solution contient le PC2 (A), le PC3 (B) et le PC4 (C) à une concentration de 1,0 mg/L dans l'eau Milli-Q.

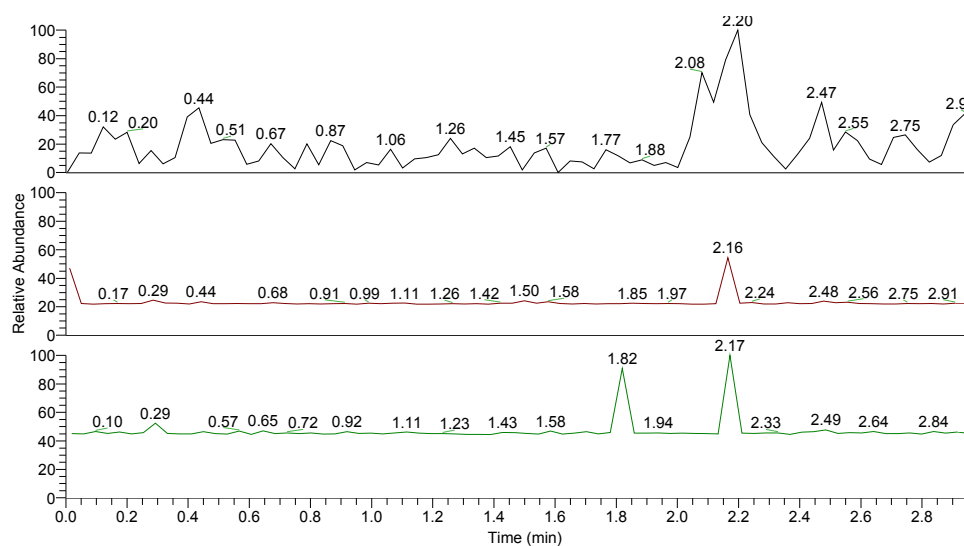


Figure 20 : Chromatogrammes de l'injection de 10 µL de la solution obtenue suite au chargement de la EPS au IEN-SM/SM.

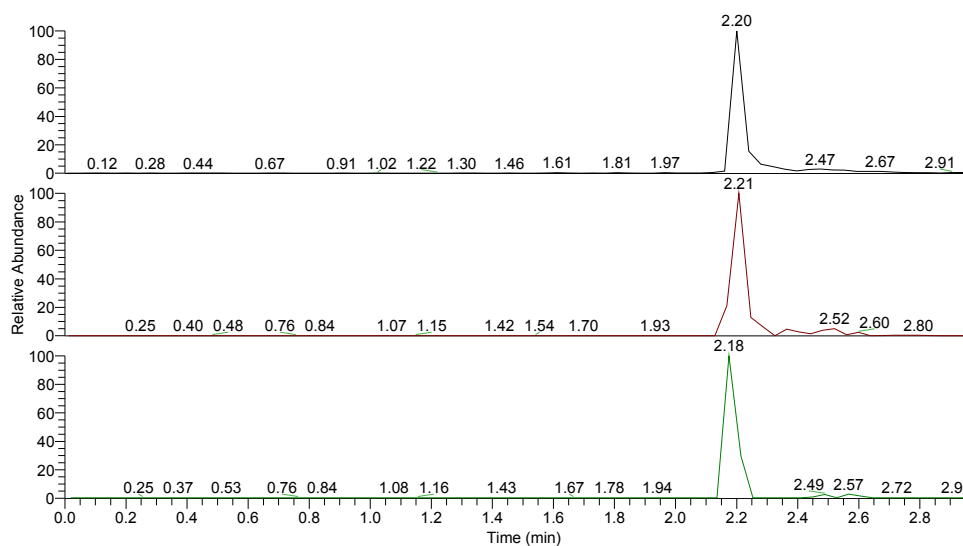


Figure 21 : Chromatogrammes de l'injection de 10 μ L de la solution obtenue suite au lavage avec le méthanol de la EPS au IEN-SM/SM.

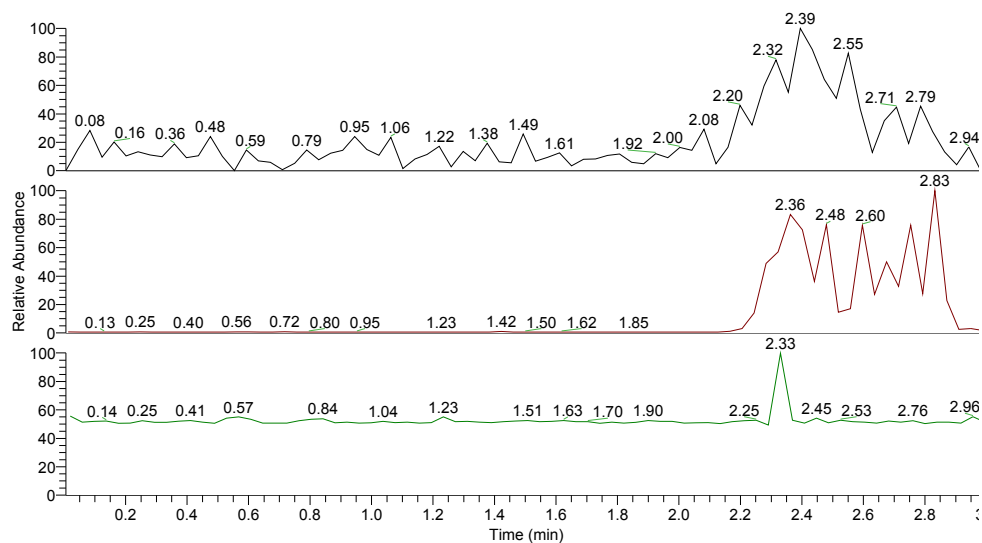


Figure 22 : Chromatogrammes de l'injection, au IEN-SM/SM, de 10 μ L de la solution obtenue suite à l'élution de la EPS avec 10 % méthanol dans 2 % v/v d'acide formique.

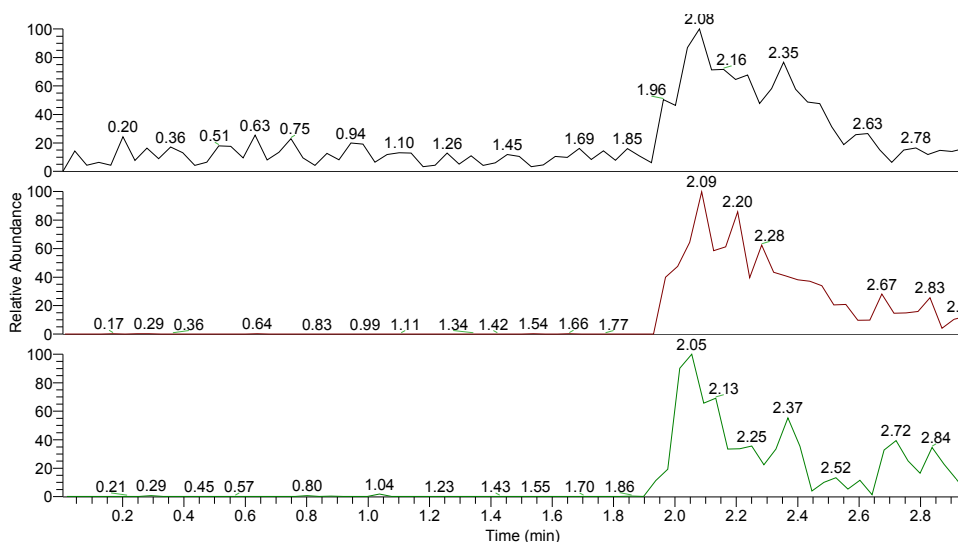


Figure 23 : Chromatogrammes de l'injection, au IEN-SM/SM, de 10 μ L de la solution obtenue suite à l'élution de la EPS avec 2 % v/v d'acide formique dans 100 % méthanol.

Subséquentement, la chromatographie d'affinité d'ion métallique immobilisé (CAIMI) a été expérimentée pour purifier la solution d'extraction. La cartouche utilisée a été la NTA Superflow de Qiagen et l'analyse des phytochélatines (PC2, PC3 et PC4) des différentes phases obtenues a été faite par CLHP-IEN-SM/SM. De plus, la comparaison des chromatogrammes obtenus avec celle de la solution standard a été réalisée.

L'idée de l'expérience était d'utiliser le Cd lié à la phase solide pour complexer de manière spécifique les phytochélatines afin de les isoler de la solution algale puis de faire varier le pH de la solution pour les élués de la phase stationnaire. Cependant, cette étude démontre que les phytochélatines n'ont pas été liés au Cd se retrouvant sur la phase stationnaire puisque les phytochélatines ont été retrouvés dans la solution après le chargement de la cartouche CAIMI, figure 25. Ainsi, il est normal que les phases subséquentes, les solutions à divers pH, ne contiennent pas de phytochélatine, figure 26 à 31. Encore une fois, la méthode de purification étudiée, la chromatographie d'affinité d'ion métallique immobilisé, n'a pas donné les résultats escomptés.

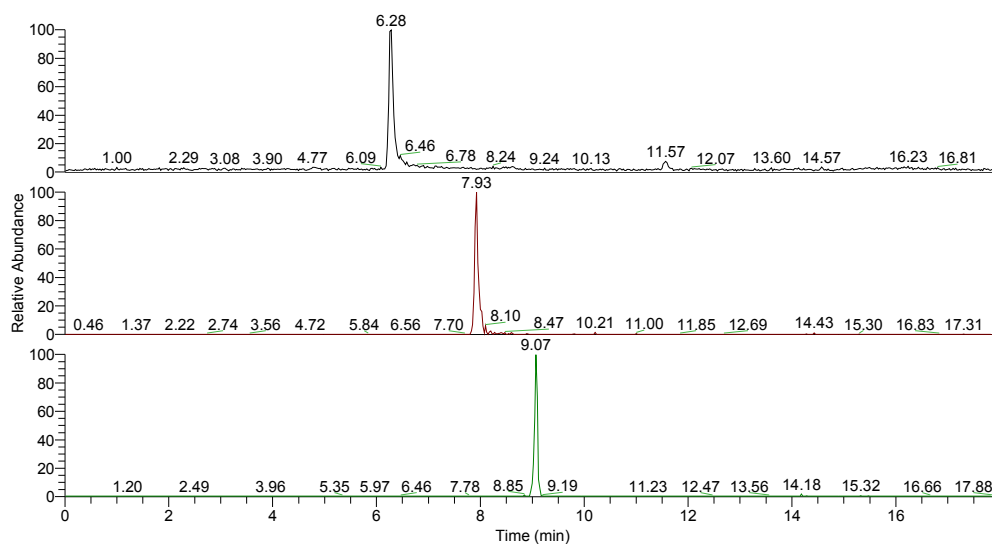


Figure 24 : Chromatogrammes de la séparation et de la détection, par le CLHP-IEN-SM/SM, de 10 μ L de la solution des standards des phytochélatines. Cette solution contient le PC2 (A), le PC3 (B) et le PC4 (C) à une concentration de 1,0 mg/L dans l'eau Milli-Q.

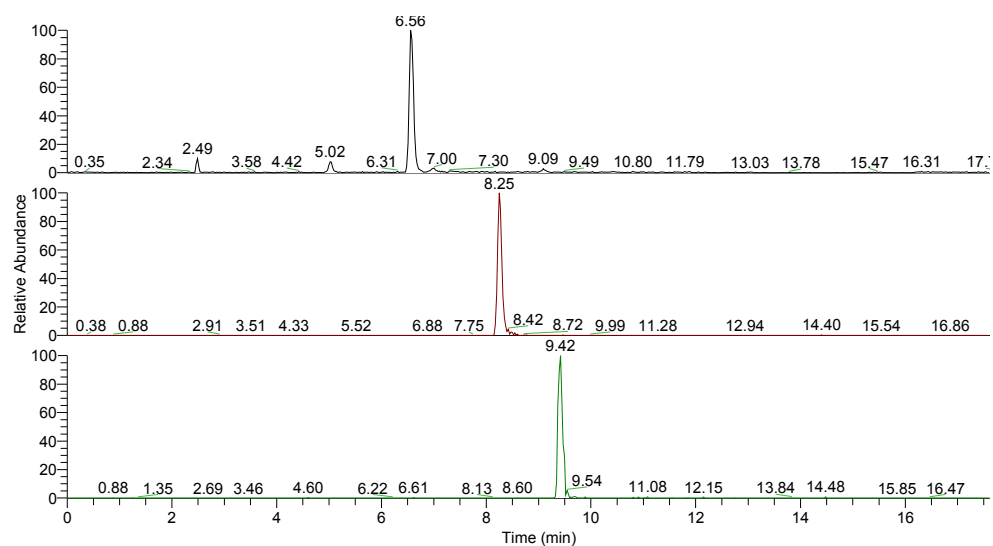


Figure 25 : Chromatogrammes de la séparation et de la détection, par le CLHP-IEN-SM/SM, de 10 μ L de la solution après le chargement des phytochélatines.

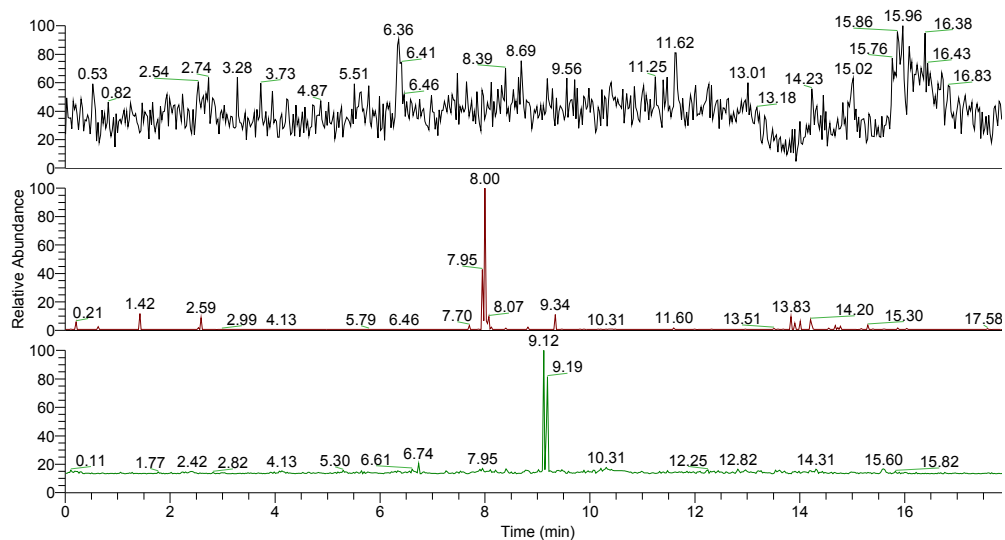


Figure 26 : Chromatogrammes de la séparation et de la détection, CLHP-IEN-SM/SM, de 10 µL de la solution de lavage (10 mL d'eau Milli-Q).

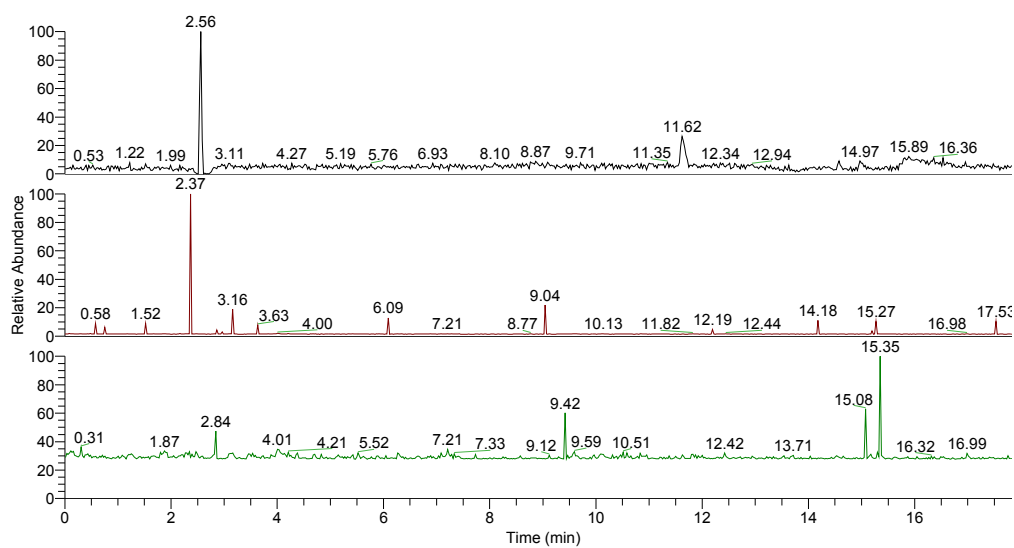


Figure 27 : Chromatogrammes de la séparation et de la détection, par le CLHP-IEN-SM/SM, de 10 µL de la solution de 25 mM DTT à un pH de 6,0.

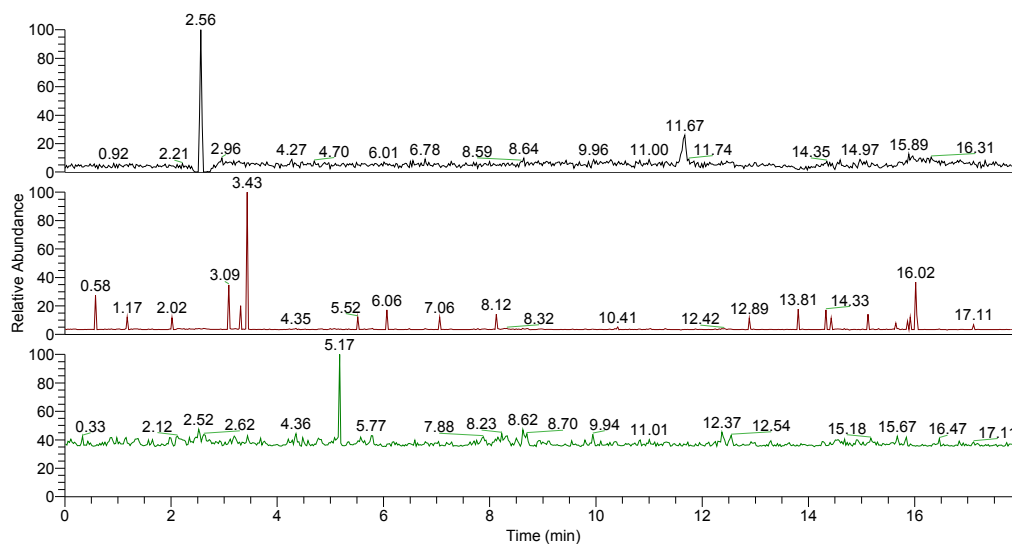


Figure 28 : Chromatogrammes de la séparation et de la détection, par le CLHP-IEN-SM/SM, de 10 µL de la solution de 25 mM DTT à un pH de 5,0.

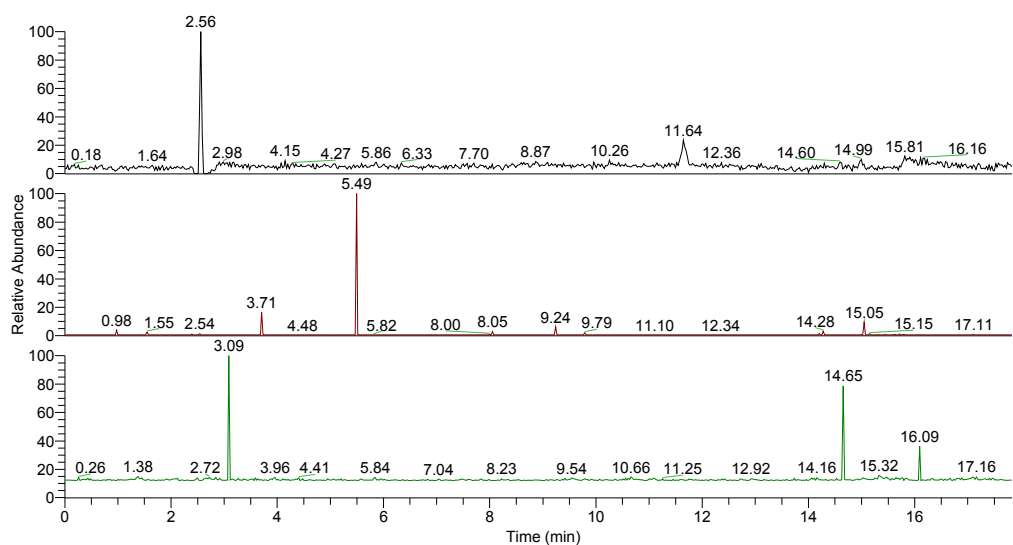


Figure 29 : Chromatogrammes de la séparation et de la détection, CLHP-IEN-SM/SM, de 10 µL de la solution de 25 mM DTT à un pH de 4,4.

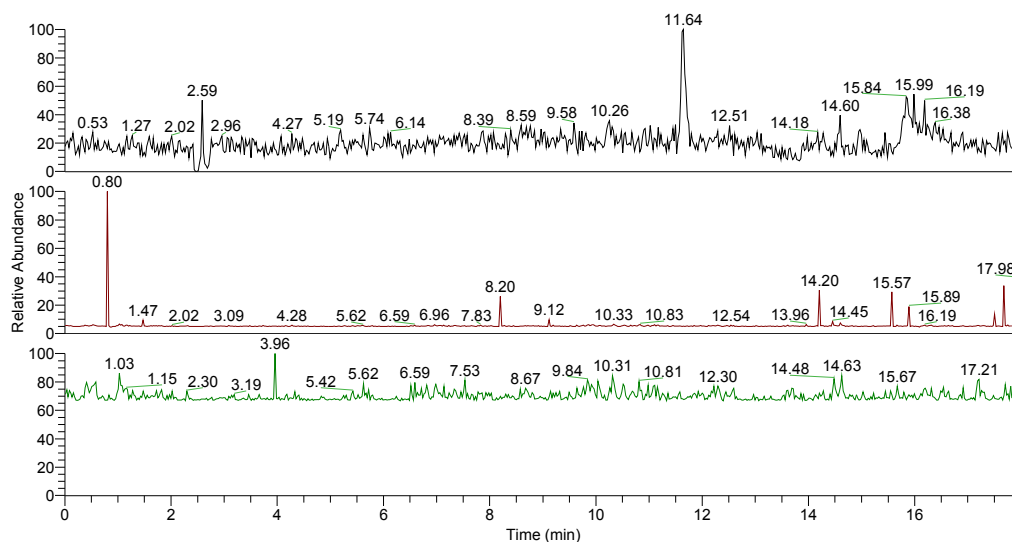


Figure 30 : Chromatogrammes de la séparation et de la détection, par le CLHP-IEN-SM/SM, de 10 μ L de la solution de 25 mM DTT à un pH de 3,0.

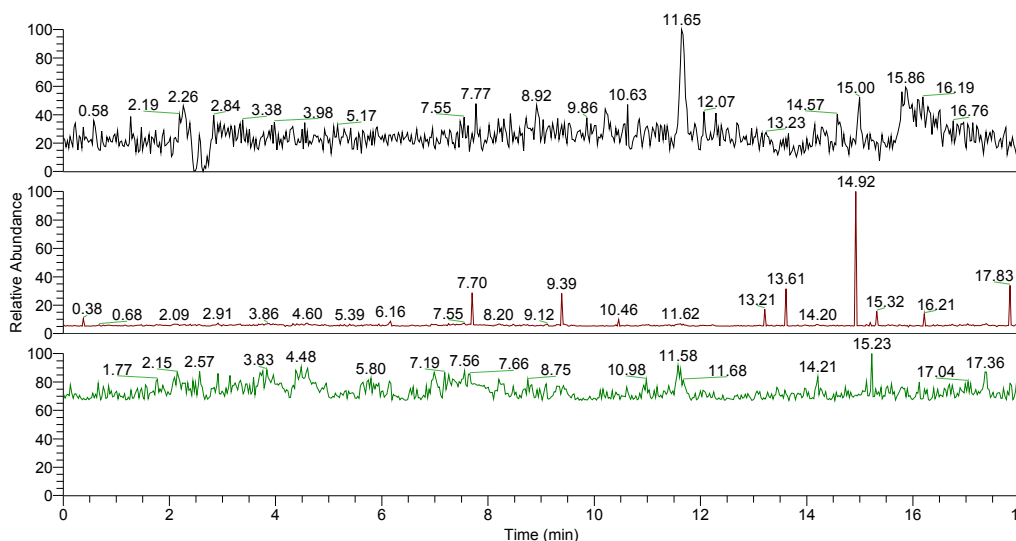


Figure 31 : Chromatogrammes de la séparation et de la détection, par le CLHP-IEN-SM/SM, de 10 μ L de la solution de 25 mM DTT à un pH de 2,1.

Finalement, la purification de la solution d'extraction des phytochélatines par la centrifugation a été expérimentée. La séparation de solide en suspension dans une solution est possible en utilisant la force centrifuge. Différentes forces g ont été testées pour séparer les débris cellulaires des phytochélatines dans la solution d'extraction. À la suite de cette étude, il s'est avéré que la majorité des débris ont

été isolés de la solution contenant les phytochélatines avec le maximum de force g possible, 16 320 x g (14 986 rpm) (Multifuge 1SR, Heraeus®, Figure 32).



Figure 32 : La solution résultante de l'extraction des phytochélatines des algues centrifugées à une force g de 11 320 (à gauche) et la même solution centrifugée à 16 320 x g (à droite).

De plus, l'identification des phytochélatines par CLHP-SM/SM dans la solution d'extraction sur les algues dopées avec le standard des phytochélatines (1,0 mg/L) à la suite de l'application de la centrifugation à 16 320 x g a été réalisée (figure 33). Le résultat a démontré que les phytochélatines n'ont pas été éliminés de la solution. Finalement, la centrifugation à 16 320 x g a été adoptée comme méthode de purification lors des manipulations subséquentes.

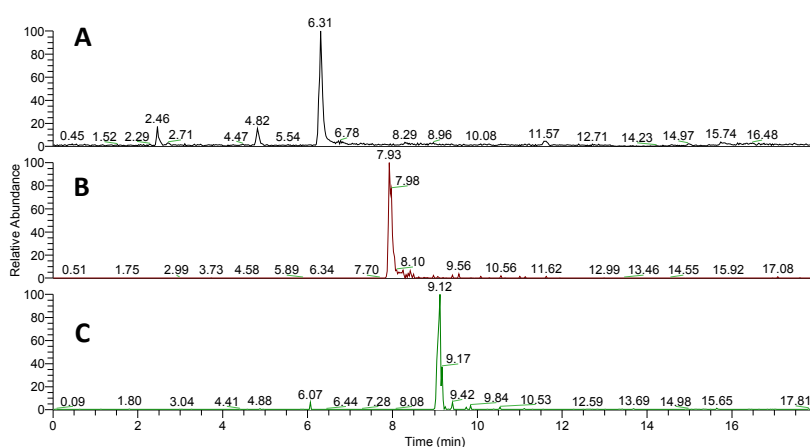


Figure 33 : Chromatogrammes de la séparation et de la détection, par le CLHP-IEN-SM/SM, de 10 μ L de la solution d'extraction des phytochélatines dopées des standards des phytochélatines. La solution des standards contient le PC2 (A), le PC3 (B) et le PC4 (C) à une concentration de 1,0 mg/L dans l'eau Milli-Q.

5.5-Validation de la méthode d'analyse :

Le domaine de linéarité de la courbe d'étalonnage de chaque phytochélatine (PC2, PC3 et PC4) a été déterminé à partir de la dilution de la solution mère (1 000,0 mg/L) afin de couvrir une gamme de concentrations allant de 1 µg/L jusqu'à 1,0 mg/L, voir la figure 34.

L'analyse de ces graphiques indique qu'il y a une tendance linéaire de l'aire en fonction de la concentration pour le PC2, mais pas pour le PC3 et le PC4. Un coefficient de détermination (R^2) de 0,985 a été retrouvé pour le PC2 par rapport à des valeurs de 0,851 et 0,541 pour les PC3 et PC4, respectivement. Malgré que chaque analyte soit présent à une concentration similaire, il y a une diminution significative de l'aire pour le PC4 comparativement au PC2 et au PC3.

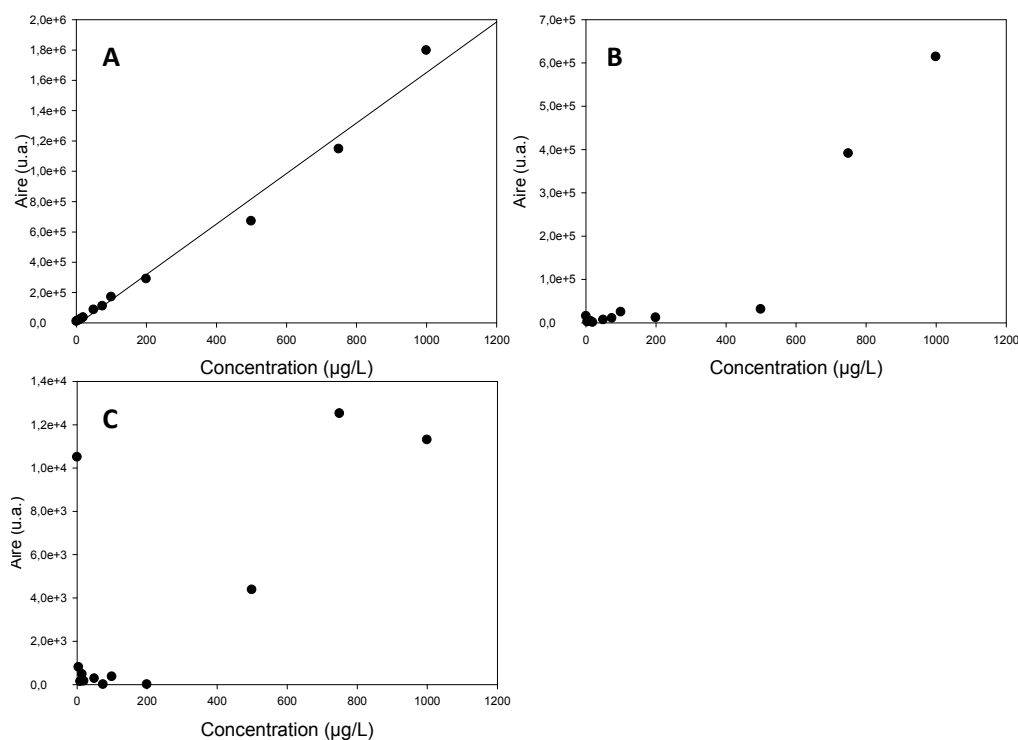


Figure 34 : Domaine de linéarité (courbe d'étalonnage) du PC2 (A), du PC3 (B) et du PC4 (C) à la suite de la séparation et la détection, par le CLHP-IEN-SM/SM, de 3 µL des solutions des standards des phytochélatines. Ces solutions contiennent le PC2 (A), le PC3 (B) et le PC4 (C) dans l'eau Milli-Q à diverses concentrations.

La solution standard des phytochélatines à la concentration de 1,0 mg/L, la même que celle injectée pour la courbe de calibration, a été analysée par l'injection au spectromètre de masse par temps de vol (SMTV), figure 35. Le résultat de cette analyse démontre que les phytochélatines forment des ponts disulfures de façon intramoléculaires en milieu aqueux. En effet, la formation de ponts disulfures se répercute par la perte de deux protons de la forme protoné et qui s'observe sur la masse/charge. Le standard de phytochélatine est vendu sous la forme réduite du thiol de la cystéine.

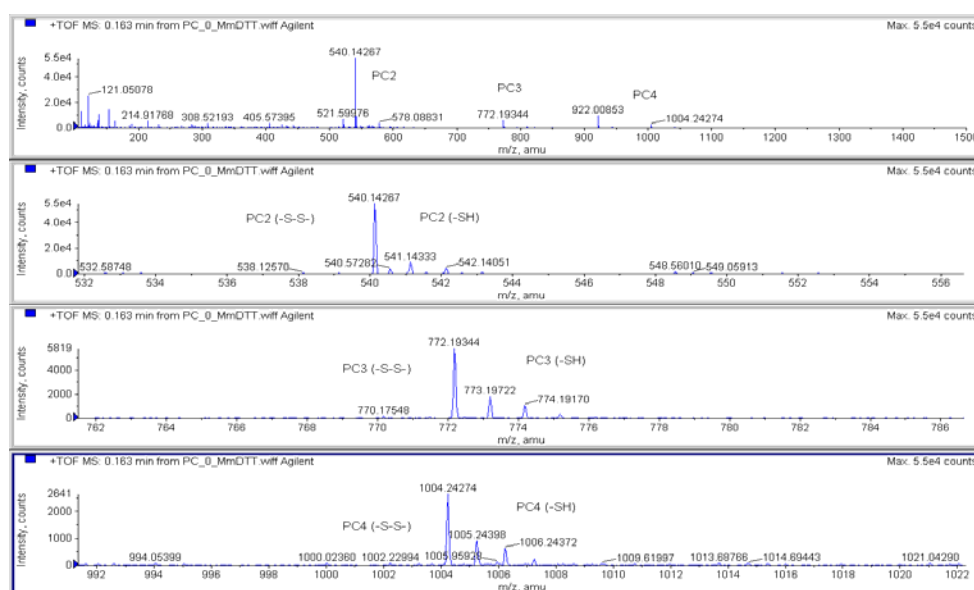


Figure 35 : Chromatogrammes de la séparation et de la détection, par le CLHP-IEN-SM (TOF), de 3 μ L de la solution des standards des phytochélatines. Cette solution contient le PC2 (A), le PC3 (B) et le PC4 (C) à une concentration de 1,0 mg/L dans l'eau Milli-Q.

Il est possible de couper les ponts disulfures et de maintenir la forme réduite du groupement –SH avec certains réactifs tels que le *DTT* ou le *2-mercaptoethanol*. La capacité réductrice permettra de maintenir le groupement thiol des phytochélatines sous forme réduite afin de pouvoir mieux les quantifier. L'efficacité du réducteur dans la solution aura pour effet de maintenir la forme réduite du thiol, ce qui se traduit par une augmentation de l'aire des pics des phytochélatines lors de l'analyse par CLHP-SM. Le DTT a été choisi pour effectuer des tests préliminaires sur le pouvoir réducteur parce qu'il est moins toxique.

La solution standard des phytochélatines dissous dans 5 mM de DTT a été analysée au spectromètre de masse par temps de vol (Figure 36). Dans ces

conditions, il a été observé que les ponts disulfures étaient défaits. En effet, l'ajout de 5 mM du réducteur a démontré une augmentation de l'aire des pics de la détection des phytochélatines (Figure 37). De plus, il a été remarqué que la tendance linéaire s'accroît pour le PC3 et le PC4 comparativement au milieu non réducteur puisqu'ils sont présents sous d'autres formes. Pour donner suite aux résultats obtenus, il est devenu important d'effectuer une étude de l'impact de la concentration de DTT sur la quantification des phytochélatines.

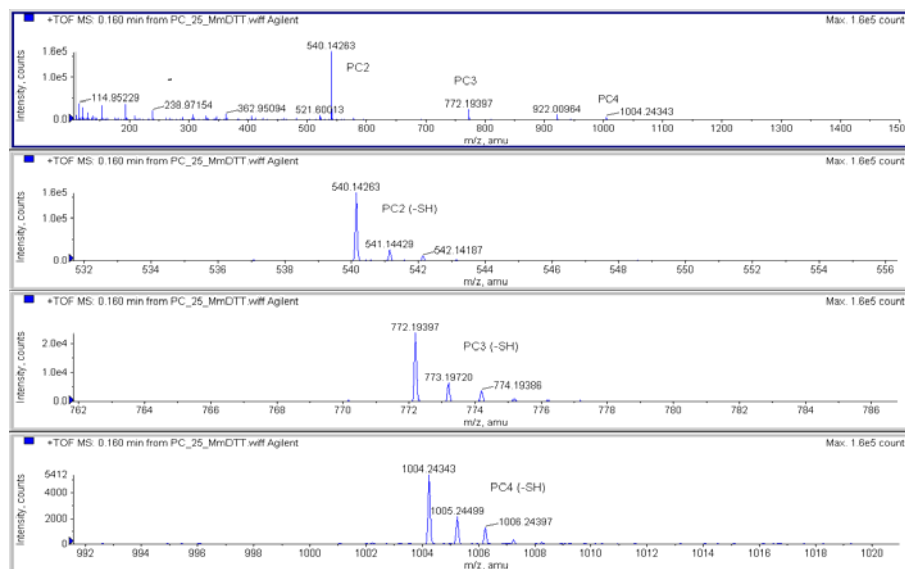


Figure 36 : Chromatogrammes de la séparation et de la détection, par le CLHP-IEN-SM (SMTV), de 3 μ L de la solution des standards des phytochélatines. Cette solution est constituée du PC2 (A), du PC3 (B) et du PC4 (C) à une concentration de 1,0 mg/L dans 25 mM DTT.

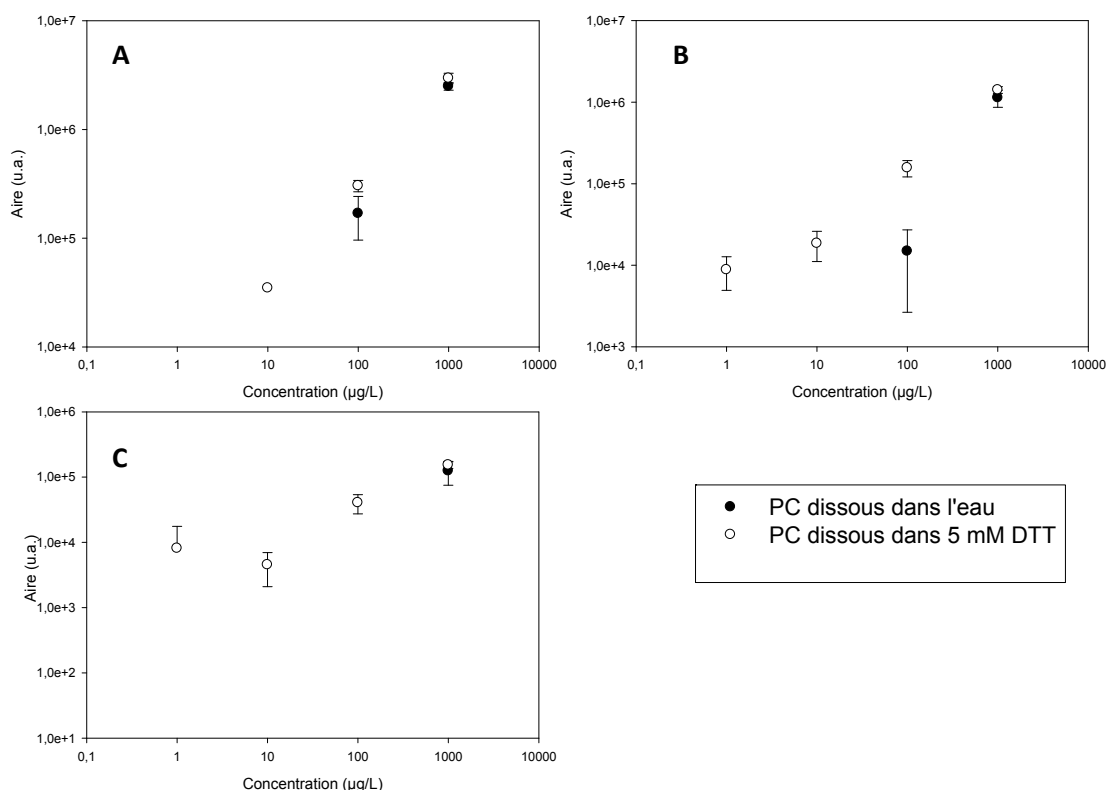


Figure 37 : Effet de 5 mM de DTT sur l'aire du PC2 (A), du PC3 (B) et du PC4 (C) dans la solution standard.

En variant les concentrations de DTT dans la solution de 0 mM à 50 mM, nous avons observé que l'aire augmente en fonction de la concentration en DTT, figure 38 et 39. De plus, la concentration en DTT ayant obtenu l'aire la plus élevée est de 25 mM pour le PC2, PC3 et PC4 (Figure 38). Par contre, l'incertitude sur le résultat à 25 mM de DTT, ne permet pas d'établir clairement que cette concentration de DTT ait pour effet d'engendrer la plus forte aire puisque le résultat avec 50 mM et son incertitude sont inclus dans celle à 25 mM de DTT.

À faible concentration en phytochélatines, la concentration en DTT ayant pour effet d'obtenir l'aire la plus élevée est de 50 mM. Encore une fois, l'incertitude sur les résultats ne permet pas de l'établir de façon claire. Peut-être que cela signifie qu'entre 25 et 50 mM de DTT un plateau est atteint. Cependant, un minimum de 25 mM de DTT devrait être ajouté à la solution afin de maintenir les phytochélatines sous forme réduits.

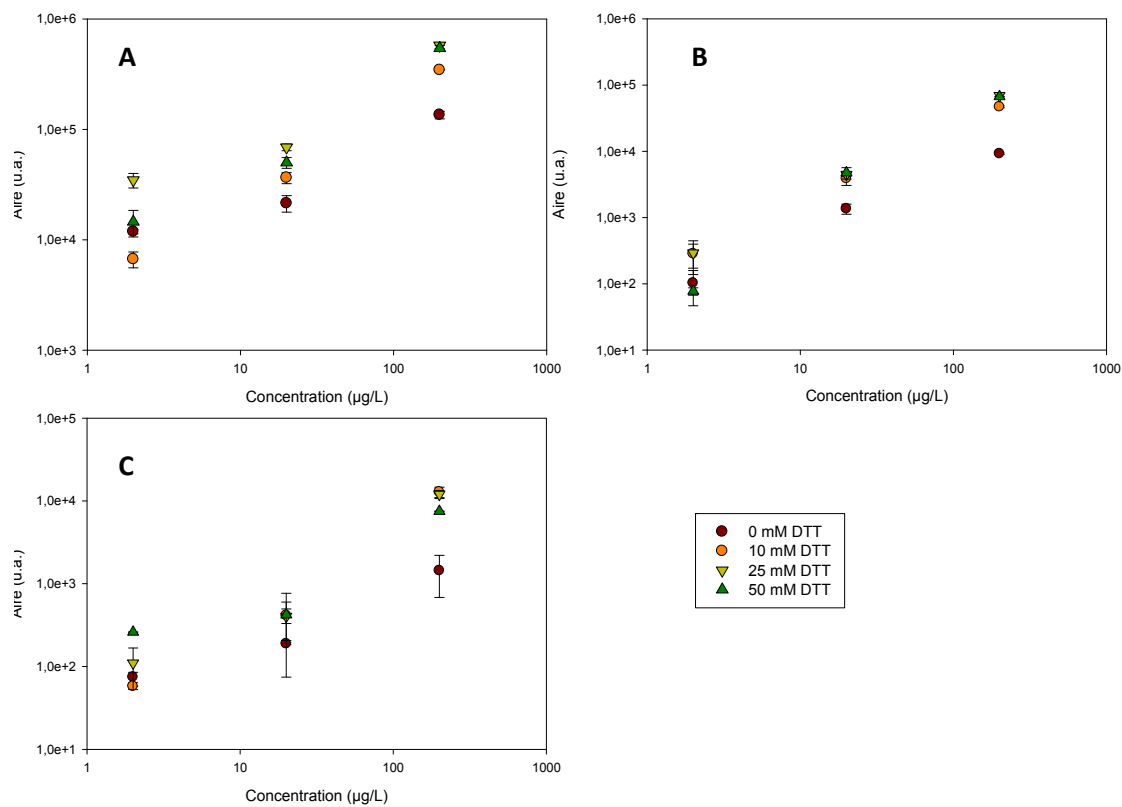


Figure 38 : Effet de la concentration du DTT sur l'aire du PC2 (A), du PC3 (B) et du PC4 (C) dans la solution standard.

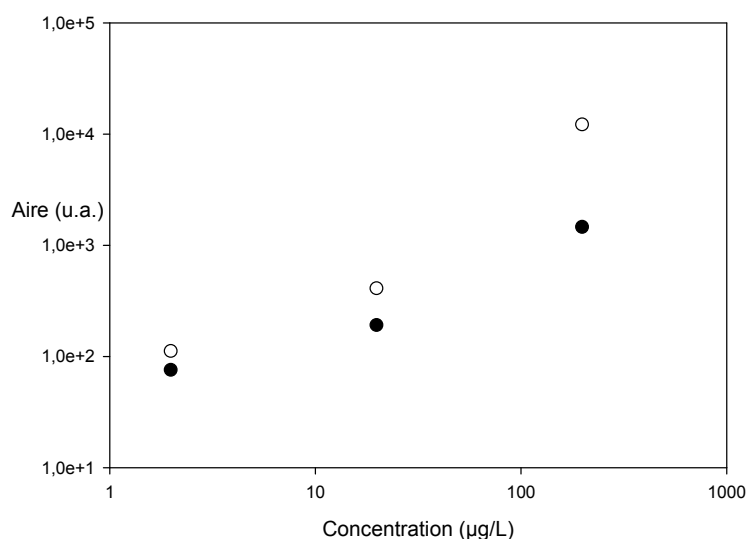


Figure 39 : Effet de la concentration du DTT sur l'aire du PC4 dans la solution standard. Le cercle noir représente la solution sans DTT tandis que le cercle blanc symbolise celle avec l'agent réducteur.

Les analyses de différentes concentrations des standards de phytochélatines en présence de 25 mM de DTT ont été effectuées par CLHP-SM/SM. Les concentrations des standards étaient les mêmes que celles utilisées lors de la réalisation de la première courbe d'étalonnage externe où aucune droite linéaire n'avait été obtenue pour le PC3 et le PC4. Cependant, dans ce cas-ci, l'aire est linéaire avec la concentration des phytochélatines (Figure 40). De plus, les valeurs des coefficients de corrélation étaient toutes supérieures à 0,995 excepté, pour le PC4 (0,998 pour le PC2, 0,997 pour le PC3 et 0,986 pour le PC4). Le LDI et le LQI ont été déterminés à partir de ces analyses (Tableau VII). Il est à remarquer que les limites ont été exprimées en µg/L. Cependant, il aurait fallu le faire sous la forme µg/g d'algues sèches. Cela aurait été possible en calculant la moyenne du poids de dix échantillons d'algues ayant subi le protocole d'analyse et séché au four.

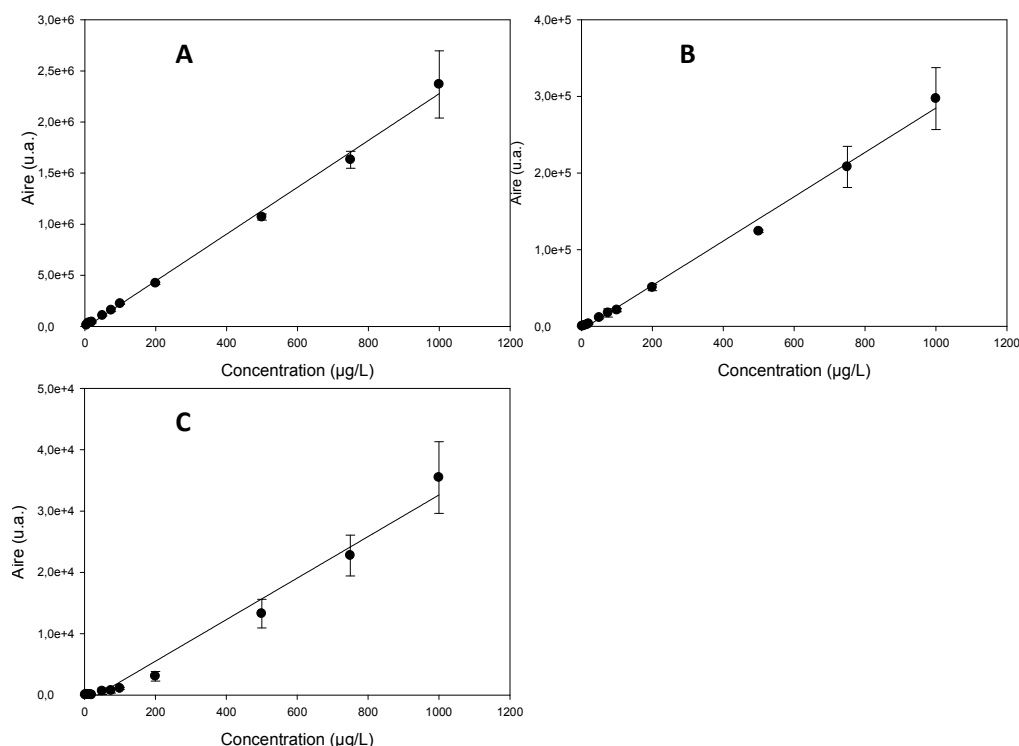


Figure 40 : Domaine de linéarité (courbe d'étalonnage) du PC2 (A), du PC3 (B) et du PC4 (C) à la suite de la séparation et la détection, par le CLHP-IEN-SM/SM, de 3 µL des standards des phytochélatines. Les solutions contiennent le PC2 (A), le PC3 (B) et le PC4 (C) à diverses concentrations. Les phytochélatines ont été dissous dans 25 mM DTT. Les équations linéaires sont pour A : $y = 2290x - 12871$, $R^2 = 0,998$, B : $y = 289x - 4274$, $R^2 = 0,996$ et C : $y = 34x - 1249$, $R^2 = 0,986$.

Tableau VII : Limite de détection instrumentale et limite de quantification instrumentale des PC2, PC3 et PC4 lors de l'analyse avec le CLHP-IEN-SM/SM.

Analyte	Limite de détection instrumentale (LDI)	Limite de quantification instrumentale (LQI)
PC2	12 µg/L	27 µg/L
PC3	31 µg/L	69 µg/L
PC4	85 µg/L	196 µg/L

La corrélation des analyses des phytochélatines dans le DTT est linéaire et, de ce fait, il sera possible de déterminer le domaine de linéarité de la méthode analytique. Pour y parvenir, l'analyse CLHP-IEN-SM/SM d'échantillons dopés a été réalisée et comparée à l'analyse des standards de phytochélatines seuls aux mêmes concentrations. Globalement, pour chaque analyte présente dans la matrice, une suppression de signal a été remarquée (par exemple Figure 40 pour le PC3). De plus, pour des analyses effectuées en présence de la matrice, la régression de

l'aire en fonction de la concentration n'est pas linéaire en contraste des résultats obtenus en absence de la matrice.

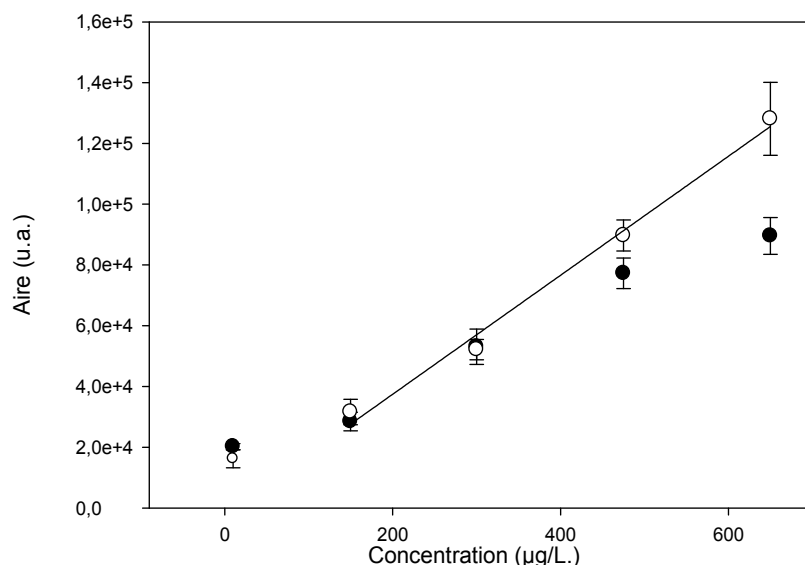


Figure 41 : Domaine de linéarité (courbe d'étalonnage) du PC3 à la suite de la séparation et de la détection, par le CLHP-IEN-SM/SM, de 3 µL des standards des phytochelatines (cercle blanc) et de 3 µL des échantillons d'algue dopés (cercle noir). Les solutions de phytochelatines sont à diverses concentrations et ils sont dissous dans 25 mM DTT. L'équation linéaire pour le standard de PC3 : $y = 196x - 1\,729$, $R^2 = 0,991$. L'expérience a été répétée trois fois. Les résultats du réplicata et d'autres phytochelatines sont donnés à la Fig. 42.

L'expérience a été répétée trois fois (figure 42). Malgré que les concentrations obtenues de la première réplique soient plus élevées que pour les expériences répétées le lendemain et le surlendemain, globalement, la même tendance a été remarquée pour les trois répliquas, c'est-à-dire, la réduction de la pente et de la reproductibilité en présence de la matrice. Notons que des analyses antérieures de solutions des standards de phytochelatines ont donné une pente qui était plus près des résultats des deuxièmes et troisièmes expériences que de la première. De ces faits, il a été justifié de négliger les résultats de la première journée lors de l'analyse.

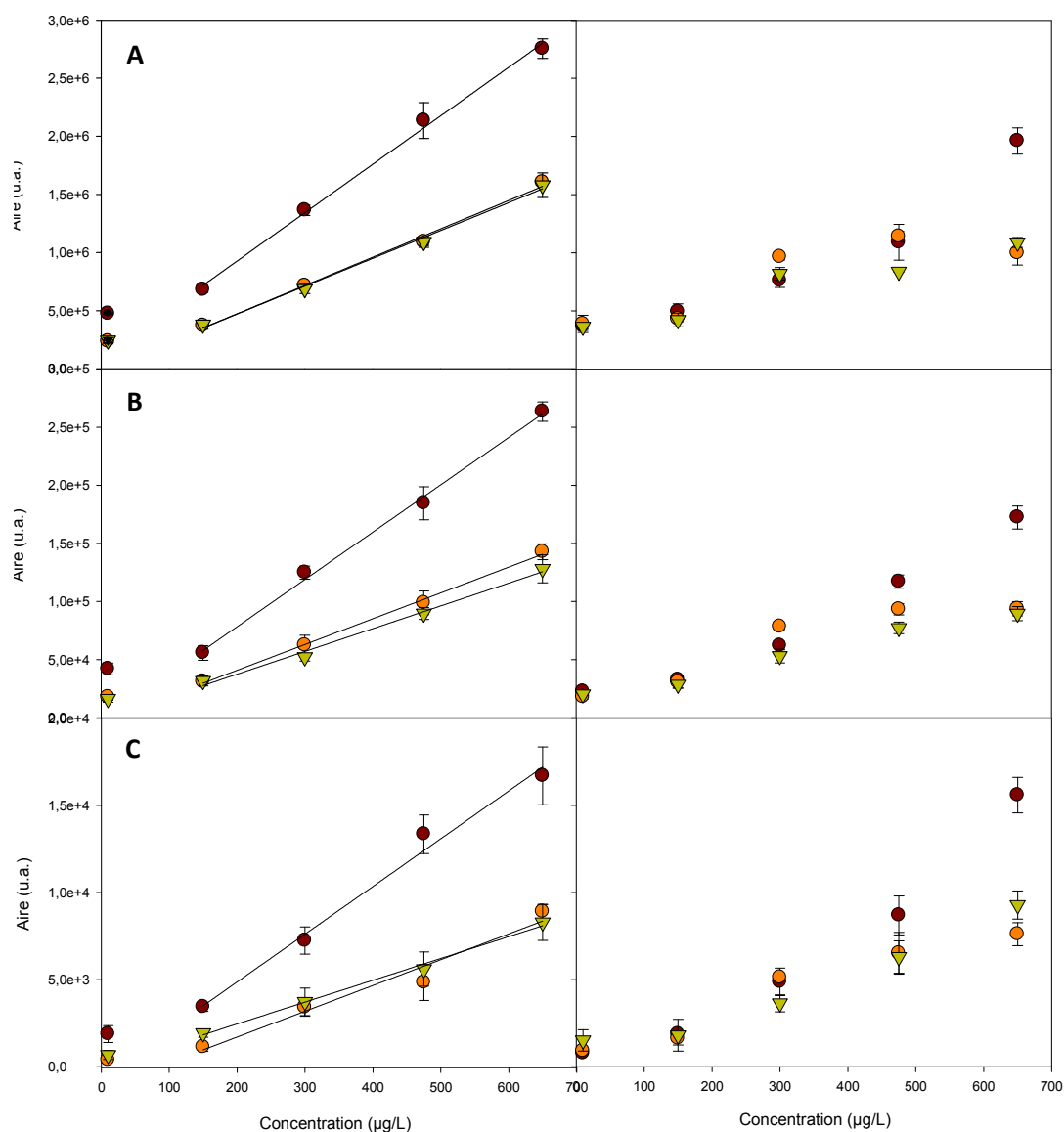


Figure 42 : Domaine de linéarité du PC2 (A), PC3 (B) et PC4 (C) à la suite de la séparation et de la détection, par le CLHP-IEN-SM/SM, de 10 µL des standards des phytochélatines (côté gauche) et de 10 µL des échantillons d'algue dopées (côté droit). Les phytochélatines sont dissoutes dans 25 mM DTT et leurs concentrations varient. L'expérience a été répétée 3 fois : la première (cercle rouge), la deuxième (cercle orange) et la troisième (triangle jaune).

Tableau VIII: La pente et le coefficient de régression au carré des équations linéaires des standards de phytochélates sans ou avec la matrice d'algues selon la journée de l'expérience.

Analyte		PC2		PC3		PC4	
Matrice		Sans	Avec	Sans	Avec	Sans	Avec
Jour 1	Pente	4167	2388	407	242	27	23
	R ²	0,997	0,907	0,997	0,958	0,988	0,945
Jour 2	Pente	2439	1180	222	132	15	11
	R ²	0,995	0,738	0,998	0,864	0,961	0,942
Jour 3	Pente	2394	1156	196	117	13	13
	R ²	0,995	0,923	0,991	0,979	0,994	0,955

L'étude avec les standards de phytochélates en absence de la matrice a démontré que les appareils de séparation et de détection pouvaient être fiables, *c'est-à-dire*, qu'ils permettent l'obtention de résultats justes et précis. Les causes de la suppression des ions de phytochélates peuvent être multiples. Dans ce cas, il est clair que la source de suppression du signal provenait de la matrice. Il est possible que la méthode de purification par centrifugation ne fût pas suffisante. En effet, la centrifugation n'avait pas une force suffisante pour éliminer tous les débris cellulaire provenant de la matrice. Ainsi, une révision de la méthode de purification serait à considérer avant de déterminer le domaine de linéarité de la méthode d'analyse.

Le but premier de ces expériences était de déterminer le domaine de linéarité de la méthode analytique. Pour faire suite à l'analyse précédente, la non-linéarité de l'aire des phytochélates dans la matrice, tenant compte de la concentration, a été démontrée. En effet, les coefficients de régression au carré des échantillons d'algue dopés sont en dessous de 0,98. Ainsi, en présence de la matrice (algues), la détermination du domaine de linéarité, de la limite de détection et de la limite de quantification de la méthode analytique n'a pas été possible. Par contre, il sera peut être envisageable lorsque le problème de suppression d'ions aura été résolu.

Lors de la détermination du domaine de linéarité, la spécificité et la fiabilité de la méthode ont été évaluées. À la lumière des résultats obtenus, il est clair que la méthode analytique pour quantifier les phytochélates induites par les algues *C. reinhardtii* n'est pas encore au point. Néanmoins, il est à rappeler que la cause pourrait être due à la suppression de signal causée lors de la purification de la solution d'analyse. En conclusion, une amélioration de la méthode de purification

s'impose. Elle pourrait corriger la spécificité de la méthode analytique et permettre l'analyse quantitative des phytochélatines.

La fiabilité de la méthode analytique a été démontrée précédemment par sa reproductibilité. Par contre, une méthode analytique fiable, mais non spécifique n'est pas intéressante sur le plan analytique. Cela dit, sur une note optimiste, son potentiel scientifique est prouvé. En effet, une étude portant sur la purification afin qu'elle arrive à maturité pour la détermination des phytochélatines induites par les algues doit être menée. Finalement, la justesse de la méthode n'a pas pu être évaluée puisqu'aucun organisme reconnu ne disposait de phytochélatines certifiés.

Pour donner suite à la variabilité observée pour les répliquas déterminés sur 3 jours, il est important d'évaluer la stabilité des phytochélatines en fonction du temps. En effet, l'aire du PC2 diminue lentement sur trois jours, et cela, pour les trois températures différentes (Figure 42a). Des résultats similaires ont été observés pour le PC3 (Figure 42b). Par contre, dans le cas du PC4, une diminution de l'aire d'environ 50 % a été remarquée pour chacune des conditions de stabilité (Figure 42c). Il est à remarquer que l'aire des phytochélatines (PC2, PC3 et PC4) diminue à chaque température. Il a été étonnant de constater que l'aire diminue même à une température de -20 °C. Par ailleurs, contrairement à nos attentes, la diminution du signal semblait moins grande à la température ambiante qu'à des températures contrôlées. Ceci permet d'émettre l'hypothèse que la dégradation des phytochélatines ait été causée par un effet physique ou chimique plutôt que par dégradation bactérienne. En guise d'exemple, à -20 °C, la congélation-décongélation de l'échantillon aurait pu accélérer la dégradation de l'échantillon. La conclusion de cette étude suggère d'effectuer la quantification des phytochélatines rapidement afin de s'assurer de la qualité des résultats.

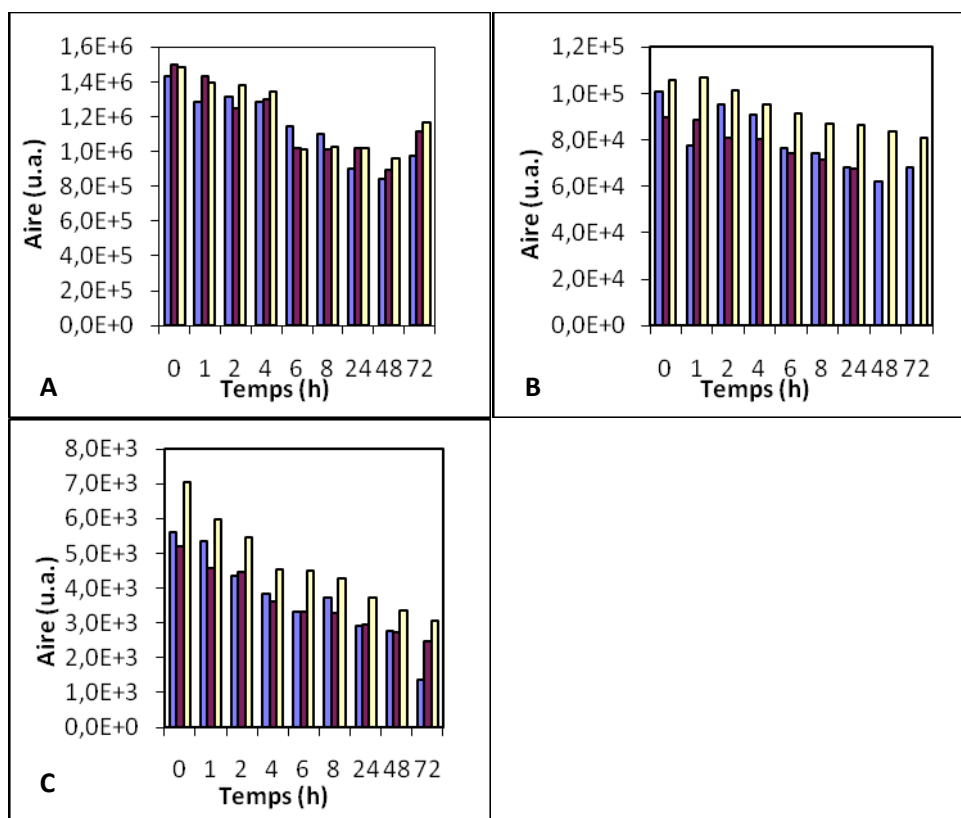


Figure 43 : Stabilité de l'aire du PC2 (A), PC3 (B) et PC4 (C) en fonction du temps selon la condition d'entreposage soit à -20°C (bleu), à 1°C (mauve) et à la température de la pièce (jaune).

5.6-Essai de la méthode d'analyse des phytochélatines sur des échantillons *ex situ* et *in situ*:

La méthode analytique n'étant pas au point, la détermination des phytochélatines induites par les algues exposées au Cd en laboratoire a été évaluée deux fois dans une expérience préliminaire. Lors de la seconde expérience, un problème au niveau du CLHP-SM/SM est survenu et aucun résultat n'a été obtenu. De plus, puisque la méthode n'est pas au point, seule une évaluation qualitative a été considérée. Néanmoins, il était possible d'affirmer l'induction des phytochélatines (PC2, PC3 et PC4) dans les algues *C. reinhardtii* pour les deux concentrations de Cd (1×10^{-7} M et 1×10^{-6} M) étudiées en fonction du temps (1, 2, 4, et 6 h) à l'exception du PC3 et PC4 à 1h (Fig. 44). Globalement, l'induction du Cd a été supérieure lors d'une exposition à une concentration de 1×10^{-6} M comparativement à celle de 1×10^{-7} M. De plus, dans le cas du PC2, l'aire semble plafonner en fonction du temps pour les deux concentrations ce qui n'est

pas le cas pour le PC3 et PC4. Cependant, il est à noter que pour ces derniers à une concentration de 1×10^{-7} M, l'aire augmente moins rapidement qu'à 1×10^{-6} M.

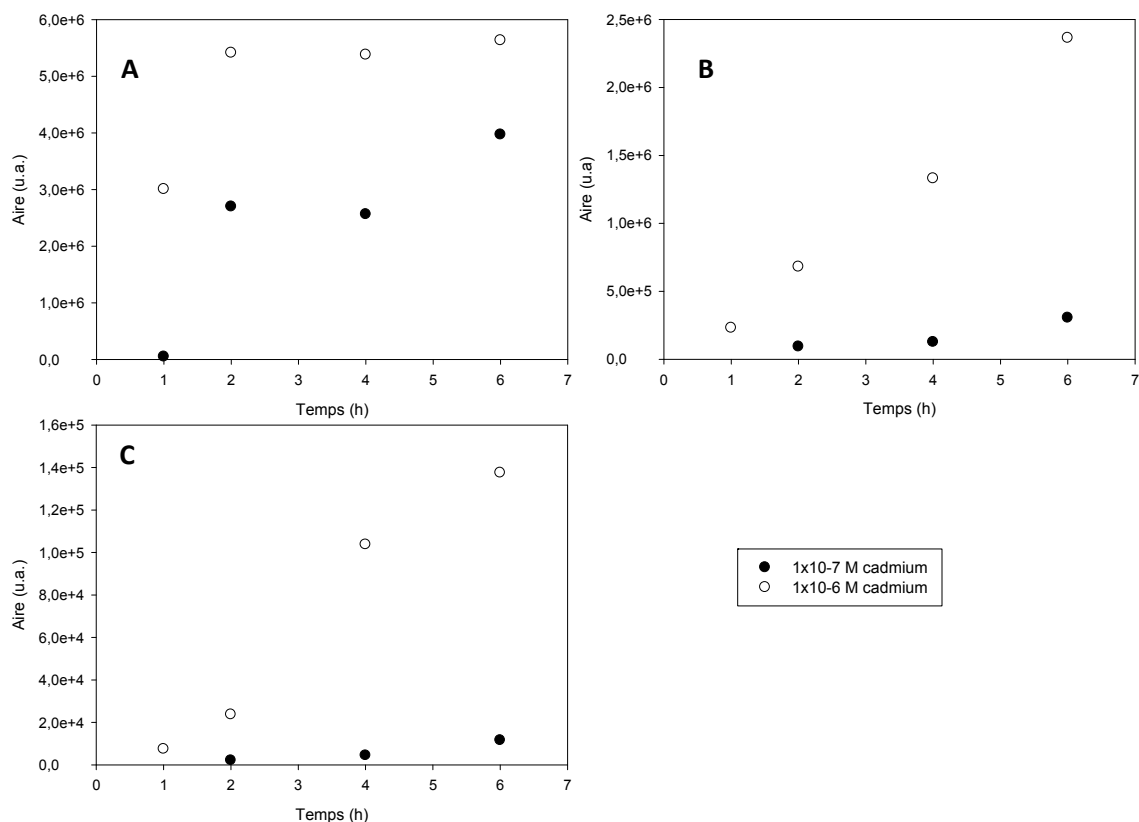


Figure 44 : Analyse du PC2 (A), PC3 (B) et PC4 (C) à la suite de la séparation et de la détection, par le CLHP-IEN-SM/SM, de 10 μ L des algues *C. reinhardtii* soumises à une concentration en Cd de 1×10^{-7} M (rond noir) et de 1×10^{-6} M (rond blanc).

La bioaccumulation du Cd dans les algues a été réalisée au même moment que l'induction des phytochélatines dans les mêmes algues. La comparaison de la tendance des résultats en fonction du temps démontre que la relation est similaire (Figure 44). Cette étude préliminaire démontre le potentiel de la méthode d'analyse des phytochélatines et permet de poursuivre l'étude sur des échantillons *in situ* afin de démontrer la capacité de la méthode d'analyse dans des conditions naturelles.

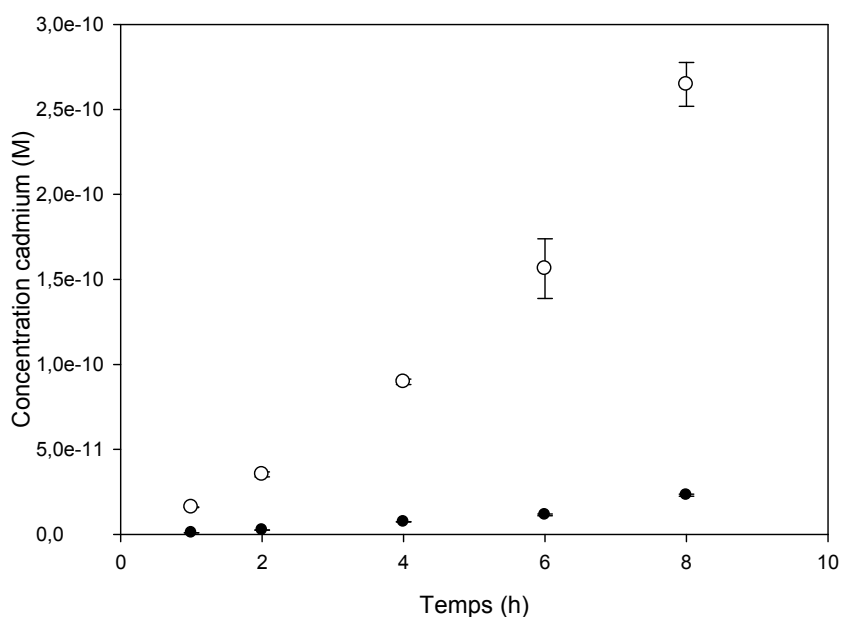


Figure 45 : Bioaccumulation des algues *C. reinhardtii* soumises à une concentration en Cd de 1×10^{-7} M (cercle noir) et à une concentration de 1×10^{-6} M (cercle blanc) effectuées au SAA.

D'autre part, dans le cadre du programme ECODIS financé par la Commission Européenne, un échantillonnage *in situ* dans les cours d'eau Riot Mort et Bouillac, en France, a été réalisé selon le protocole décrit dans la section méthodologie. Malheureusement, le courant du congélateur à -80 °C où les échantillons ont été entreposés a été coupé pendant plusieurs jours et la température a été stabilisée à celle de la pièce où le congélateur est placé. Compte tenu de ce fait, les échantillons n'ont pas été analysés comme convenu.

6-CONCLUSION :

La présence des ions précurseurs des analytes et leurs fragments a été validée par le CLHP-SM/SM. Aussi, l'élaboration de la méthode séparative par le CLHP-SM/SM d'un mélange des standards de phytochélatines (PC2, PC3 et PC4) dissous dans l'eau a été réalisée. Cette étude a montré que les phytochélatines sont détectables et identifiables par ce procédé.

Sur le plan méthodologique, le choix de la colonne et de la phase mobile a été entrepris afin de maximiser la réponse instrumentale. La comparaison entre la colonne Eclipse XDB et la Proteo a indiqué que la répétabilité analytique de l'injection ainsi que la séparation des analytes (aspect des pics, temps de rétention) de la première colonne sont supérieures à la deuxième. Compte tenu des résultats obtenus, la colonne Eclipse XDB a été choisie pour séparer les phytochélatines. Pour ce qui est de la phase mobile, l'acétonitrile présente un meilleur choix que le méthanol puisque le temps de rétention des phytochélatines a été plus court. Notons que suite à une pénurie mondiale d'acétonitrile, ce solvant a été remplacé en fin d'études par le méthanol.

La méthode analytique CLHP-SM/SM a été comparée à celle CLHP avec la détection par fluorescence. D'abord, il a été démontré que l'agent réducteur DTT interfère lors de la réaction de dérivation du thiol par le mBrB. Par la suite, il semble que la méthode dérivative a été moins sensible que celle par spectrométrie de masse. Cependant, seule une étude approfondie des limites de détections et des limites de quantifications pourrait le démontrer clairement.

La procédure d'extraction des phytochélatines des algues conduit à l'obtention d'une solution qui renferme beaucoup de débris cellulaires. Il est nécessaire de retirer les débris cellulaires et plusieurs méthodes de purification ont été testées. La première procédure qui a été étudiée est la filtration. L'utilisation d'un filtre ayant 0.22 μm de diamètre de pores a démontré que la solution résultante présente toujours des débris cellulaires. Ensuite, l'extraction en phase solide a été utilisée et ce protocole n'a pas fonctionné pour purifier la solution. En effet, la présence de débris a été identifiée et l'élution des phytochélatines dans plusieurs phases a été prouvée. Ultérieurement, la méthode de purification par la CAIMI a montré que les phytochélatines n'ont pas été liées au Cd se retrouvant sur la phase stationnaire.

Cela écarte la possibilité de purification de la solution d'extraction des phytochélatines. Finalement, la purification de cette solution a été réalisée par la centrifugation où la majorité des débris a été isolées de la solution avec une force de $16\,320 \times g$ ($14\,986 \text{ rpm}$).

D'autre part, la validation de la méthode analytique des phytochélatines extraits des algues à la suite de l'exposition au Cd a été effectuée. Dans un premier temps, il a été prouvé que les phytochélatines forment des ponts disulfures en milieu aqueux. De plus, l'utilisation de 25 mM de DTT lors de la dissolution des phytochélatines a permis d'obtenir le domaine de linéarité des PC2, PC3 et PC4 qui a été de $1 \mu\text{g/L}$ jusqu'à $1,0 \text{ mg/L}$. Le LDI et le LQI ont été déterminés et il aurait fallu le faire sous la forme $\mu\text{g/g}$ d'algues sèches au lieu de l'exprimer en $\mu\text{g/L}$. Par la suite, la détermination du domaine de linéarité d'échantillons dopés a été réalisée et comparée à l'analyse des standards de phytochélatines aux mêmes concentrations. Pour chaque analyte présent dans la matrice, une suppression de signal a été remarquée et la régression de l'aire en fonction de la concentration n'est pas linéaire comparativement aux phytochélatines en l'absence de la matrice. Il est possible que la cause de la suppression des ions de phytochélatines puisse être la méthode de purification de la solution d'extraction. Ainsi, une révision de la méthode de purification serait à considérer avant de déterminer le domaine de linéarité de la méthode d'analyse.

Un autre point qui a été évalué concerne la stabilité des phytochélatines. Cette étude a démontré qu'il y a diminution de l'aire des phytochélatines à chaque température. Il se pourrait que la cause de la dégradation des phytochélatines soit physique ou chimique plutôt que bactérienne. Finalement, il est important d'accomplir la quantification des phytochélatines aussitôt que possible.

Des échantillons d'algues qui ont été exposées au Cd en laboratoire sont soumis à la méthode de détermination des phytochélatines. L'identification des phytochélatines (PC2, PC3 et PC4) dans les algues *C. reinhardtii* a été possible aux deux concentrations de Cd ($1 \times 10^{-7} \text{ M}$ et $1 \times 10^{-6} \text{ M}$) et à chaque temps examiné (1, 2, 4, et 6 h) à l'exception du PC3 et PC4 à 1h. L'induction du Cd a été supérieure lors d'une exposition à une concentration de $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ comparativement à $1 \times 10^{-7} \text{ M}$. De plus, la comparaison avec la tendance des

résultats de la bioaccumulation du Cd dans les algues en fonction du temps démontre que la relation est similaire. Ces résultats ont permis d'étendre l'étude à des échantillons *in situ*. *L'échantillonnage a été réalisé durant l'été 2008 dans les cours d'eau* Riou Mort et Bouillac, en France. Cependant, les échantillons qui ont été rapportés n'ont pas été analysés puisque le courant du congélateur a été coupé et les spécimens ont été détruits par la chaleur sur une longue période de temps.

À la lumière des résultats présentés, il a été établi que la méthode pour quantifier les phytochélatines produites par les algues n'est pas encore au point. Nonobstant, la suppression de signal produite lors de la purification de la solution d'analyse pourrait être à l'origine de cet aboutissement. Néanmoins, une amélioration de la méthode de purification pourrait corriger les interférences dues aux débris cellulaires et permettre l'analyse quantitative de ces biomarqueurs dans les eaux douces.

7- Bibliographie :

1. Alberich, A.; Arino, C.; Diaz-Cruz, J. M.; Esteban, M., Multivariate curve resolution applied to the simultaneous analysis of electrochemical and spectroscopic data: Study of the Cd(II)/glutathione-fragment system by voltammetry and circular dichroism spectroscopy. *Analytica Chimica Acta* **2007**, 584, (2), 403-409.
2. Cadmium in Drinking-water. *World Health Organization* **2004**, http://www.who.int/water_sanitation_health/dwg/chemicals/cadmium.pdf, consulté le 2010 janvier 24.
3. Air Quality Guidelines. *WHO Regional Office for Europe* **2002**, http://www.euro.who.int/document/aig/6_3cadmium.pdf, consulté le 2010 janvier 24.
4. Prasad, M. N. V., Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. *Environmental and Experimental Botany* **1995**, 35, (4), 525-545.
5. Kawakami, S. K.; Gledhill, M.; Achterberg, E. P., Determination of phytochelatin and glutathione in phytoplankton from natural waters using HPLC with fluorescence detection. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **2006**, 25, (2), 133-142.
6. Ahner, B. A.; Kong, S.; Morel, F. M. M., Phytochelatin production in marine-algae.1. an interspecies comparison. *Limnology and Oceanography* **1995**, 40, (4), 649-657.
7. Ahner, B. A.; Morel, F. M. M., Phytochelatin production in marine-algae.2. induction by various metals. *Limnology and Oceanography* **1995**, 40, (4), 658-665.
8. Kola, H. Bio-physicochemical Parameters Influencing Cadmium Uptake by the Unicellular Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. thèse no 3601, Université de Genève Genève 2004.
9. Fojta, M.; Fojtova, M.; Havran, L.; Pivonkova, H.; Dorcak, V.; Sestakova, I., Electrochemical monitoring of phytochelatin accumulation in *Nicotiana tabacum* cells exposed to sub-cytotoxic and cytotoxic levels of cadmium. *Analytica Chimica Acta* **2006**, 558, (1-2), 171-178.
10. Cobbett, C.; Goldsbrough, P., Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology* **2002**, 53, 159-182.
11. Grill, E.; Winnacker, E. L.; Zenk, M. H., Phytochelatins - the principal heavy-metal complexing peptides of higher-plants. *Science* **1985**, 230, (4726), 674-676.
12. Rauser, W. E., Phytochelatins. *Annual Review of Biochemistry* **1990**, 59, 61-86.
13. Benoit, G.; Oktay, S.; Cant, A.; Hood, M. O.; Coleman, C. H.; Corapcioglu, O. and Santschi, P. H., Partitioning of Cu, Pb, Ag, Zn, Fe, Al and Mn between filter-retained particles, colloids and solution in 6 Texas estuaries. *Marine Chemistry* **1994**, 45, (307-336).
14. Howe, G.; Merchant, S., Heavy metal-activated synthesis of peptides in *Chlamydomonas-reinhardtii*. *Plant Physiology* **1992**, 98, (1), 127-136.
15. Ahner, B. A.; Price, N. M.; Morel, F. M. M., Phytochelatin production by marine-phytoplankton at low free metal-ion concentrations-laboratory studies and field data from Massachusetts Bay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1994**, 91, (18), 8433-8436.
16. Le Faucheur, S. B., Renata; Sigg, Laura, Thiol and Metal Contents in Periphyton Exposed to Elevated Copper and Zinc Concentrations: A Field and Microcosm Study. *Environmental Science and Technology* **2005**, 39, (20), 8099-8107.
17. Le Faucheur, S. B., Renata; Sigg, Laura, Phytochelatin induction, cadmium accumulation, and algal sensitivity to free cadmium ion in *Scenedesmus vacuolatus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2005**, 24, (7), 1731-1737.

18. Grill, E.; Winnacker, E. L.; Zenk, M. H., Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1987**, *84*, (2), 439-443.
19. Perales-Vela, H. V.; Pena-Castro, J. M.; Canizares-Villanueva, R. O., Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere* **2006**, *64*, (1), 1-10.
20. Le Faucheur, S. S., Fabian; Behra, Renata; Sigg, Laura, Thiols in *Scenedesmus vacuolatus* upon exposure to metals and metalloids *Aquatic Toxicology* **2006**, *80*, (4), 355-361.
21. Mehra, R. K.; Tarbet, E. B.; Gray, W. R.; Winge, D. R., Metal specific synthesis of 2 metallothioneins and gamma-glutamyl-transferase peptides in *Candida glabrata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1988**, *85*, (23), 8815-8819.
22. Rauser, W. E., Structure and function of metal chelators produced by plants - The case for organic acids, amino acids, phytin, and metallothioneins. *Cell Biochemistry and Biophysics* **1999**, *31*, (1), 19-48.
23. Grill, E.; Löffler, S.; Winnacker, E. L.; Zenk, M. H., Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific gamma-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1989**, *86*, (18), 6838-6842.
24. Rauser, W. E., Phytochelatins and related peptides -structure, biosynthesis, and function. *Plant Physiology* **1995**, *109*, (4), 1141-1149.
25. Vatamaniuk, O. K.; Mari, S.; Lang, A.; Chalasani, S.; Demkiv, L. O.; Rea, P. A., Phytochelatin synthase, a dipeptidyltransferase that undergoes multisite acylation with gamma-glutamylcysteine during catalysis - Stoichiometric and site-directed mutagenic analysis of *Arabidopsis thaliana* PCS1-catalyzed phytochelatin synthesis. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, (21), 22449-22460.
26. Strasdeit, H.; Duhme, A. K.; Kneer, R.; Zenk, M. H.; Hermes, C.; Nolting, H. F., Evidence for discrete Cd(SCYS)₄ units in cadmium phytochelatin complexes from EXAFS spectroscopy. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* **1991**, (16), 1129-1130.
27. Bramanti, E.; Toncelli, D.; Morelli, E.; Lampugnani, L.; Zamboni, R.; Miller, K. E.; Zemetra, J.; D'Ulivo, A., Determination and characterization of phytochelatins by liquid chromatography coupled with on line chemical vapour generation and atomic fluorescence spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1133*, (1-2), 195-203.
28. Wang, H. O.; Shan, X. Q.; Zhang, S. Z.; Wen, B., Preliminary characterization of a light-rare-earth-element-binding peptide of a natural perennial fern *Dicranopteris dichotoma*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2003**, *376*, (1), 49-52.
29. Scarano, G.; Morelli, E., Properties of phytochelatin-coated CdS nanocrystallites formed in a marine phytoplanktonic alga (*Phaeodactylum tricornutum*, Bohlin) in response to Cd. *Plant Science* **2003**, *165*, (4), 803-810.
30. Polec-Pawlak, K.; Ruzik, R.; Lipiec, E., Investigation of Cd(II), Pb(II) and Cu(I) complexation by glutathione and its component amino acids by ESI-MS and size exclusion chromatography coupled to ICP-MS and ESI-MS. *Talanta* **2007**, *72*, (4), 1564-1572.
31. Knauer, K.; Ahner, B.; Xue, H. B.; Sigg, L., Metal and phytochelatin content in phytoplankton from freshwater lakes with different metal concentrations. *Environmental Toxicology and Chemistry* **1998**, *17*, (12), 2444-2452.

32. Ferrat, L.; Pergent-Martini, C.; Romeo, M., Assessment of the use of biomarkers in aquatic plants for the evaluation of environmental quality: application to seagrasses. *Aquatic Toxicology* **2003**, *65*, (2), 187-204.
33. Keltjens, W. G.; van Beusichem, M. L., Phytochelatins as biomarkers for heavy metal stress in maize (*Zea mays* L) and wheat (*Triticum aestivum* L): Combined effects of copper and cadmium. *Plant and Soil* **1998**, *203*, (1), 119-126.
34. Keltjens, W. G.; van Beusichem, M. L., Phytochelatins as biomarkers for heavy metal toxicity in maize: Single metal effects of copper and cadmium. *Journal of Plant Nutrition* **1998**, *21*, (4), 635-648.
35. Ahner, B. A.; Lee, J. G.; Price, N. M.; Morel, F. M. M., Phytochelatin concentrations in the equatorial Pacific. *Deep-Sea Research Part I-Oceanographic Research Papers* **1998**, *45*, (11), 1779-1796.
36. Ahner, B. A.; Morel, F. M. M.; Moffett, J. W., Trace metal control of phytochelatin production in coastal waters. *Limnology and Oceanography* **1997**, *42*, (3), 601-608.
37. Wei, L. P.; Donat, J. R.; Fones, G.; Ahner, B. A., Interactions between Cd, and Cu, and Zn influence particulate phytochelatin concentrations in marine phytoplankton: Laboratory results and preliminary field data. *Environmental Science & Technology* **2003**, *37*, (16), 3609-3618.
38. Morelli, E.; Fantozzi, L., Phytochelatins in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* bohlin: An evaluation of their use as biomarkers of metal exposure in marine waters. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **2008**, *81*, (3), 236-241.
39. Fan, T. W. M.; Lane, A. N.; Higashi, R. M., An electrophoretic profiling method for thiol-rich phytochelatins and metallothioneins. *Phytochemical Analysis* **2004**, *15*, (3), 175-183.
40. Chekmeneva, E.; Prohens, R.; Daaz-Cruz, J. M.; Arino, C.; Esteban, M., Thermodynamics of Cd²⁺ and Zn²⁺ binding by the phytochelatin (gamma-Glu-Cys)(4)-Gly and its precursor glutathione. *Analytical Biochemistry* **2008**, *375*, (1), 82-89.
41. Wei, Z. G.; Wong, J. W. C.; Chen, D. Y., Speciation of heavy metal binding non-protein thiols in *Agropyron elongatum* by size-exclusion HPLC-ICP-MS. *Microchemical Journal* **2003**, *74*, (3), 207-213.
42. Sestakova, I.; Mader, P., Voltammetry on mercury and carbon electrodes as a tool for studies of metallothionein interactions with metal ions. *Cellular and Molecular Biology* **2000**, *46*, (2), 257-267.
43. Yosypchuk, B.; Sestakova, I.; Novotny, L., Voltammetric determination of phytochelatins using copper solid amalgam electrode. *Talanta* **2003**, *59*, (6), 1253-1258.
44. Alberich, A.; Arino, C.; Diaz-Cruz, J. M.; Esteban, M., Soft modelling for the resolution of highly overlapped voltammetric peaks: application to some Pb-phytochelatin systems. *Talanta* **2007**, *71*, (1), 344-352.
45. Cao, X. D.; Zhao, G. W.; Yin, M.; Li, J. X., Determination of ultratrace rare earth elements in tea by inductively coupled plasma mass spectrometry with microwave digestion and AG50W-x8 cation exchange chromatography. *Analyst* **1998**, *123*, (5), 1115-1119.
46. Szpunar, J.; Chassaigne, H.; Makarov, A.; Lobinski, R., Limitations of high performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric detection for speciation analysis of trace metals in biological samples. *Chemia Analityczna* **1999**, *44*, (3), 351-362.
47. Szpunar, J., Bio-inorganic speciation analysis by hyphenated techniques. *Analyst* **2000**, *125*, (5), 963-988.

48. Szpunar, J.; McSheehy, S.; Polec, K.; Vacchina, V.; Mounicou, S.; Rodriguez, I.; Lobinski, R., Gas and liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry detection for environmental speciation analysis - advances and limitations. **2000**, 779-793.
49. Leopold, I.; Gunter, D.; Neumann, D., Application of high performance liquid chromatography - inductively coupled plasma mass spectrometry to the investigation of phytochelatin complexes and their role in heavy metal detoxification in plants. *Analysis* **1998**, 26, (6), M28-M32.
50. Vacchina, V.; Polec, K.; Szpunar, J., Speciation of cadmium in plant tissues by size-exclusion chromatography with ICP-MS detection. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **1999**, 14, (10), 1557-1566.
51. Bluemlein, K.; Raab, A.; Feldmann, J., Stability of arsenic peptides in plant extracts: off-line versus on-line parallel elemental and molecular mass spectrometric detection for liquid chromatographic separation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2009**, 393, (1), 357-366.
52. Lobinski, R. S.; Szpunar, J., Biochemical speciation analysis by hyphenated techniques. **1999**, 321-332.
53. Lobinski, R. S.; Pereiro, I. R.; Chassaigne, H.; Wasik, A.; Szpunar, J., Elemental speciation and coupled techniques - towards faster and reliable analyses - Plenary Lecture. **1998**, 859-867.
54. Vacchina, V.; Chassaigne, H.; Oven, M.; Zenk, M. H.; Lobinski, R., Characterisation and determination of phytochelatins in plant extracts by electrospray tandem mass spectrometry. *Analyst* **1999**, 124, (10), 1425-1430.
55. Chassaigne, H.; Lobinski, R., Characterization of metallothionein isoforms by reversed-phase high-performance liquid chromatography with on-line post-column acidification and electrospray mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* **1998**, 829, (1-2), 127-136.
56. Yen, T. Y.; Villa, J. A.; DeWitt, J. G., Analysis of phytochelatin-cadmium complexes from plant tissue culture using nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry and capillary liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **1999**, 34, (9), 930-941.
57. Mounicou, S.; Vacchina, V.; Szpunar, J.; Potin-Gautier, M.; Lobinski, R., Determination of phytochelatins by capillary zone electrophoresis with electrospray tandem mass spectrometry detection (CZE-ES MS/MS). *Analyst* **2001**, 126, (5), 624-632.
58. El-Zohri, M. H. A.; Cabala, R.; Frank, H., Quantification of phytochelatins in plants by reversed-phase HPLC-ESI-MS-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2005**, 382, (8), 1871-1876.
59. Perez-Rama, M.; Vaamonde, E. T.; Alonso, J. A., Capillary zone electrophoresis for analysis of phytochelatins and other thiol peptides in complex biological samples derivatized with monobromobimane. *Electrophoresis* **2005**, 26, (3), 610-620.
60. Zhang, W. H.; Cai, Y., Purification and characterization of thiols in an arsenic hyperaccumulator under arsenic exposure. *Analytical Chemistry* **2003**, 75, (24), 7030-7035.
61. Thibault, P., Spectrométrie de masse. *Note de cours CHM 3102, Université de Montréal* **2009**, 23.
62. CEAEQ, *Protocole pour la validation d'une méthode d'analyse en chimie*. Bibliothèque et Archives nationales du Québec: Québec, Canada, 2007; p 1-29.
63. Eurachem, The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. *United Kingdom* **1998**, 75.

64. C.E.A.E.Q, Protocole pour la validation d'une méthode d'analyse en chimie *Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec* **2007**, Québec, Canada, 30.
65. Pelchat, J., L'induction de phytochélatines (PC) chez *Chlamydomonas reinhardtii* suite à son exposition à la nanoparticule quantique CdTe. . *Rapport de stage, Université de Montréal* **2008**, 6.
66. Hassler, C. S., Slaveykova, V.I. and K.J. Wilkinson, Discriminating between intra- and extracellular metals using chemical extractions. *Limnology and Oceanography, methods* **2004**, 2, 237-247.
67. Varian, User guide for graphite tube atomiser AA240Z/GTA120. **2005**, 42.
68. Morelli, E.; Scarano, G., Synthesis and stability of phytochelatins induced by cadmium and lead in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Marine Environmental Research* **2001**, *52*, (4), 383-395.
69. Davis, T. A., SUBS- Stirred Underwater Biouptake System : A new in-situ tool for the exposure and analysis of microorganisms in natural aquatic systems. *submit to env. Science tech* **2009**.
70. Product speciations Finnigan TSQ Quantum Ultra AMTM. *Thermo Fisher Scientific inc.* **2007**, consulté le 2008 septembre 24.
71. Phytochelatin. *Anaspec inc.* **2008**, <http://search.anaspec.com/?keywords=phytochelatin>, consulté le 2008 septembre 24.

Annexe 1 : Diagramme de sélection du mode de séparation [72].

Sample MW	Sample Solubility	Separation Mode	Our Recommended Column	Page		
MW < 2000	Organic-Soluble	Normal Phase Adsorption	Luna Silica(2)	158		
			Onyx Silica	185		
		Normal Phase Bonded	Luna CN, NH ₂	158		
			Reversed Phase Bonded	Synergi Max-RP, Fusion-RP	237	
		Luna C8(2), C18(2)		158		
	THF-Soluble	Gel Permeation GPC	Gemini C18	126		
			Phenogel 50 Å, 100 Å	192		
	MW > 2000	Organic-Soluble	Gel Permeation Chromatography (GPC)	Shodex GPC	220	
				Unknown MW Range	Phenogel Linear (2)	192
				Shodex GPC	220	
				Known MW Range	Specific Pore Phenogel	192
				Shodex GPC	220	
		Aqueous-Soluble	Gel Filtration Aqueous GFC/SEC	pH 2-7.5	BioSep-SEC-S Series	95
				Shodex OHpak	220	
pH > 7.5			PolySep-GFC-P	204		
			Ion-Exchange	Cation-Exchange	Shodex IEC CM-825	220
Anion-Exchange				Shodex IEC DEAE	220	
Reversed Phase				pH 2-10	Jupiter 300 C4, C5, C18	143
			pH > 10	PolymerX RP-1	203	
Hydrophobic Interaction (HIC)			Hamilton PRP-3	132		
			Shodex HIC	220		
	Affinity/Bioaffinity		Shodex AFpak	220		

Annexe 2 : La table des valeurs de t de Student [73].

Table 4-2

Values of Student's t

Degrees of freedom	Confidence level (%)						
	50	90	95	98	99	99.5	99.9
1	1.000	6.314	12.706	31.821	63.657	127.32	636.619
2	0.816	2.920	4.303	6.965	9.925	14.089	31.598
3	0.765	2.353	3.182	4.541	5.841	7.453	12.924
4	0.741	2.132	2.776	3.747	4.604	5.598	8.610
5	0.727	2.015	2.571	3.365	4.032	4.773	6.869
6	0.718	1.943	2.447	3.143	3.707	4.317	5.959
7	0.711	1.895	2.365	2.998	3.500	4.029	5.408
8	0.706	1.860	2.306	2.896	3.355	3.832	5.041
9	0.703	1.833	2.262	2.821	3.250	3.690	4.781
10	0.700	1.812	2.228	2.764	3.169	3.581	4.587
15	0.691	1.753	2.131	2.602	2.947	3.252	4.073
20	0.687	1.725	2.086	2.528	2.845	3.153	3.850
25	0.684	1.708	2.060	2.485	2.787	3.078	3.725
30	0.683	1.697	2.042	2.457	2.750	3.030	3.646
40	0.681	1.684	2.021	2.423	2.704	2.971	3.551
60	0.679	1.671	2.000	2.390	2.660	2.915	3.460
120	0.677	1.658	1.980	2.358	2.617	2.860	3.373
∞	0.674	1.645	1.960	2.326	2.576	2.807	3.291

Note: In calculating confidence intervals, σ may be substituted for s in Equation 4-6 if you have a great deal of experience with a particular method and have therefore determined its "true" population standard deviation. If σ is used instead of s , the value of t to use in Equation 4-6 comes from the bottom row of Table 4-2.

Annexe 3 – Article à être publié dans *l'International Journal of Environmental Analytical Chemistry*.

L'article suivant est un condensé de ce mémoire. Il a été accepté par *l'International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. Suite aux corrections qui ont été effectuées, cet article est en attente de publication par le journal.

Determination of phytochelatins in algal samples using LC-MS

Roxane England and Kevin J. Wilkinson*

Department of Chemistry

University of Montreal

P.O. Box 6128, Downtown Station

Montreal, QC, H3C 3J7

Abstract

The objective of this study was to develop a tool to assess the bioavailability of Cd in freshwaters. An analytical method was developed to measure the induction of phytochelatins (PC) by *Chlamydomonas reinhardtii* using online HPLC-ESI-MS/MS. PC determinations were validated and detection limits were determined. It was shown that the presence of dithiothreitol (DTT) was necessary in order to maintain the PC in their reduced form. Sample preparation was shown to be extremely important. The stability of the PC were evaluated under a number of conditions: PC degraded with time under all examined conditions, including freezing.

Introduction

The bioavailability of trace metals is very much influenced by their chemical speciation in the natural environment, the presence of trace metal competitors and hardness metals (Ca, Mg) and physical parameters such as temperature and ionic strength [74]. It is thus difficult to perform simple *chemical* measurements that are useful for monitoring subtle perturbations of trace metal bioavailability or risk in the natural environment. Biomarkers can be one tool to evaluate organism health in the presence of contaminants such as trace metals.

Phytochelatins (PC) are intracellular polypeptides having the general structure $(\gamma\text{Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ ($n=2$ to 11) [11, 14] that are produced by a number of aquatic organisms following their exposure to toxic trace metals such as Cd, Cu, Zn, Hg and Pb [6, 10-12]. Indeed, several studies on marine and freshwater alga have demonstrated that intracellular PC concentrations increase with increasing concentrations of metals [6, 7, 15-17, 20], including Cd [7, 11, 18, 31]. For example, Ahner et al. [7] have shown that several species of phytoplankton from Cd contaminated (≥ 30 nM) marine systems had elevated PC concentrations that were in line with concentrations found in the laboratory under similar conditions [15]. Such studies suggest that PC concentrations could be used as a biomarker for trace concentrations of metals.

Several analytical techniques have been employed to quantify PC. For example, reverse phase liquid chromatography (RP-HPLC) [58, 59] has been employed for the past twenty years in concert with absorbance or fluorescence detection, following derivatization [59]. Voltamperometric detection [5, 43, 58, 59] appears to be as much

as 1000x more sensitive than absorbance [43]. More recently, PC identification has been accomplished by electrospray ionization mass spectrometry either alone (ESI-MS) or in tandem (ESI-MS/MS) [5, 54, 58, 60]. By coupling RP-HPLC and mass spectrometric detection, instrument detection limits (IDL) on the order of the femtomole have been attained for the determination of oxidized and reduced thiols in animal fluids [5].

The overall goal of this study was to develop an analytical method to evaluate Cd bioavailability in natural waters, more precisely by quantifying phytochelatin production by a unicellular alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. In a first step, the chromatographic separation (RP-HPLC) was optimized using a mixture of phytochelatin standards (PC2, PC3 and PC4) in water. Following electrospray ionization, the PC were analysed by a triple quadrupole MS in selected reaction monitoring (SRM) mode in order to determine calibration curves and detection limits. Finally, phytochelatins were determined in algae that had been exposed to Cd in the laboratory.

Materials and Methods:

All polymerware employed for the experiments was first soaked for 24 hours in 0.1 M HNO₃ (Sigma-Aldrich), rinsed 6x with Milli-Q water (R>18 MΩ cm, TOC<2 µg C L⁻¹) and then dried in a laminar flow hood.

Maintenance and exposure of the algae. Wild type WT-2137 *C. reinhardtii* was obtained from the Chlamy Center of Duke University. A small quantity of algae was sampled from the agar plate and inoculated in a sterilized TAP (Tris-Acetate-Phosphate) growth medium [75] under a 12:12 h light: dark regime of 50 µE of fluorescent white light and rotary shaking, (100 rpm) at 20 °C (Multitron, Infors HT). Algae were grown until their mid exponential growth ($1.5\text{--}3.0 \times 10^6$ cell mL⁻¹) as determined by particle counter measurements (Multisizer 3, Beckman Coulter). Cell surface areas were also determined with the particle counter. The cells were diluted to 10^5 cell mL⁻¹ in a renewed growth medium and once again incubated until mid-exponential growth, prior to the centrifugation and washing of the cell pellet.

An aliquot of the algal cell concentrate was pipetted into a TAP exposure solution containing no trace metals (TAP-TM) except Cd ($\leq 10^{-6}$ M) in order to obtain a final algal surface area of 1 cm² mL⁻¹. Citrate (0.01 M) was added to the solutions to buffer Cd²⁺ concentrations in order to avoid Cd depletion that would limit Cd bioavailability. Sixty mL of algal solution was sampled following exposures of 1, 2, 4, 6 and 8 hours. Cd bioaccumulation was stopped by adding 5 mL of EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate, Sigma-Aldrich, final

concentration 0.001 M) to the algae prior to their centrifugation for 4 minutes at 2150 x g [66].

Extraction of phytochelatins. The algal pellet was washed with a TAP-TM solution, transferred to an Eppendorf tube where it was re-centrifuged for 5 minutes at 10390 x g (4° C, AccuSpin Micro R, Fisher Scientific) and then frozen (-80 °C) until extraction. One (1.0) mL of 25 mM DTT (4 °C, Sigma-Aldrich) was added to the thawed pellet (no DDT was employed in preliminary experiments). The sample was vortexed for 1 minute, sonicated (40 kHz, Branson5510) for 2 minutes then again centrifuged for 20 minutes at 10390 x g (4° C). Following removal of the supernatant, the pellet was extracted an additional 2x. The combined supernatants were centrifuged for 4 minutes at 16320 x g (Multifuge 1SR, Heraeus) then lyophilized (Freezemobile 35 LE, VirTis) and frozen (-80 °C) until analysis.

Validation of the HPLC-ESI-MS/MS technique. PC2, PC3 and PC4 were quantified by HPLC-ESI-MS/MS (ThermoFinnigan Surveyor HPLC system, Thermo Fisher Scientific TSQ Quantum Ultra AM quadrupole). Validation consisted of a linearity determination from a standard addition of 5 PC standards (1-1000 µg L⁻¹) in water or in algae that were not exposed to Cd. Instrument and method detection limits were determined from the signal obtained from a blank solution or a solution containing 300 µg L⁻¹ of PC. The chromatographic parameters used for the detection of the PC are given in Table 1.

Results and Discussion:

Validation. For the PC standards in water, good linearity was obtained as a function of concentration for PC2 ($R^2=0.985$). For PC3 ($R^2=0.851$) and PC4 ($R^2=0.541$), an increase in measured peak areas was observed with concentration, however, the correlation was very poor. For similar (mass) concentrations of the three PC standards, peak areas for PC4 were significantly lower than those observed for PC2 and PC3. It was hypothesized that the smaller peak areas obtained for PC4 and the poor correlation obtained for PC3 and PC4 may have been due to the formation of intramolecular disulfur bridges. Since it is possible to maintain the reduced $-SH$ group by adding reducing agents to the PC such as DTT (DL-dithiothreitol) or TCEP (tris(2-carboxyethyl)phosphine) [14]. Given its lower cost and lower corrosiveness, DTT was employed in this study [5, 58]. Indeed, the presence of 5 mM of DTT resulted in a significant increase in the peak areas for PC3 and PC4 and a better linearity at the low concentrations that were examined ($0 - 200 \mu\text{g L}^{-1}$) (*cf.* Fig. 1 and Fig. 2). Although the addition of both 25 and 50 mM DDT consistently improved linearity and signal, no consistent advantage was found to adding the higher concentration. When PC standards were re-run in the presence of 25 mM of DTT (Fig. 3), both determination coefficients (PC2: 0.998; PC3: 0.997; PC4: 0.986) and slopes were improved (PC2: 2290; PC3: 289; PC4: 34) as compared to results obtained in its absence. Instrument detection limits (IDL) and quantification limits (IQL) determined from those analyses are given in Table 2.

Elution profiles (Fig. 4, 5) resembled those of El-Zohri et al. [14] and Simmons et al. [22], except that elution times were substantially shorter for the PC. When PC standards were spiked into algal homogenates, a suppression of the MS signal was

observed for each of the PC (*cf.* Fig. 4 and Fig. 5) and the regression of signal intensity as a function of concentration was less linear (Figure 6). Although calibration curves could still be employed for quantitative determinations, clearly, more optimization is still warranted prior to systematic use of the method. Several attempts were made to purify the PC using Cd bound IMAC (NTA Superflow, Qiagen) columns (data not shown), SPE (Oasis MAX, Waters) columns (data not shown) and simply centrifugation (16320 x g). While the signal reduction was still large, the most reproducible improvements of PC signal quality were obtained by the removal of algal cell debris by centrifugation.

As mentioned above, calibration slopes consistently decreased when in the presence of algal matrix. Nonetheless, a note of caution is required. Experiments were repeated in triplicate on three separate days. It was observed that peak areas determined on the first day of experiments were significantly higher than those obtained on subsequent days (Table 3). The source of this observed decrease in slope was thus evaluated by evaluating the stability of the PC standards with time for a number of different sample preservation conditions.

PC were prepared then run following storage at 3 different temperatures (-20°C , 1°C and room temperature). For PC2 and PC3, storage under all three conditions had a small, but significant effect on measured peak areas (Fig. 7). Furthermore, for PC4, a very large decrease in surface area was observed. It was surprising to observe that peak areas decreased even when the sample was stored at -20°C . Indeed, the decrease in signal appeared to be less important at room temperature than for the samples at the controlled (colder) temperatures. This suggested that the PC

degradation may have been caused by a physical (e.g. due to ice formation) rather than chemical or biological degradation. Nonetheless, it should be noted that these experiments were performed in the absence of the algal matrix and in the presence of 25 mM DTT. In the presence of algae, intracellular enzymes would surely be expected to contribute to an additional biochemical degradation of the phytochelatins.

Recent studies have demonstrated the critical importance of reducing phytochélatine degradation. For example, Simmons et al. [22] greatly reduced PC degradation by preparing their samples in an oxygen free environment (Ar). Similarly, phytochelatins

were stable for more than 4-6 weeks at 4 °C once derived with mBBr for fluorescence analysis [23]. At the very least, Fig. 7 demonstrates that great care and multiple calibrations are required for LC-MS analysis of the PC.

PC analysis in *C. reinhardtii* following exposure to Cd. PC concentrations were evaluated following the exposure of *C. reinhardtii* to Cd. PC were generally observed for each of the Cd exposure concentrations (1×10^{-7} M et 1×10^{-6} M) and at all exposure times (1, 2, 4, and 6 hours) with the exception of PC3 and PC4, which were not observed at 1 hour (Fig. 8). Globally, induction was superior following exposure to 10^{-6} M Cd (10^{-7} M Cd^{2+}) as compared to 10^{-7} M Cd (10^{-8} M Cd^{2+}). In the case of PC2, peak areas appeared to stabilize for both Cd concentrations while they appeared to increase over time for PC3 and PC4. This saturation of the PC2 concentrations was expected, as the smaller PC2 peptides are used to synthesize the larger peptides (PC3, PC4). Furthermore, as expected, PC

concentrations increased more quickly following induction at 10^{-7} M Cd^{2+} with respect to 10^{-8} M Cd^{2+} . Both Cd concentrations generally resulted in PC concentrations that were well above the detection limits of the HPLC-ESI-MS/MS.

Conclusion :

In summary, it was shown that the PC form disulfur bridges in aqueous media, but for analytical purposes the bridges can be dissolved using 25 mM DTT. In DTT, the PC could be quantified by HPLC-ESI-MS/MS for concentrations ranging from $1\ \mu\text{g L}^{-1}$ to $1.0\ \text{mg L}^{-1}$. While signal suppression was observed in the presence of the algal matrix, the calibration curve remained fairly linear. Further studies should focus on the sample clean-up step in order to completely reduce signal suppression. Additionally, analysts should pay special attention to standard and sample conditions since all PC solutions were shown to degrade with time whether at -20°C , 1°C or room temperature. It is thus likely important to analyze natural PC samples as quickly as possible in order to minimize degradation or to work under inert conditions, especially in the presence of the algae. Finally, the developed analytical technique was successful to measure the induction of PC by *Chlamydomonas reinhardtii* exposed to 10^{-7} and 10^{-6} M Cd under laboratory conditions. With some modifications of the analytical method, including better PC clean-up, the technique will surely become a useful biomarker for Cd bioavailability in natural waters.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the support of the NSERC MITHE Research Network. A complete list of MITHE sponsors is available at www.mithe-morg. Technical assistance from Alexandra Furtus Karine Venne, Marie-Claude Denis and Marie-Christine Tang is greatly appreciated. Comments from a knowledgeable reviewer are greatly appreciated.

Bibliography

1. Alberich, A.; Arino, C.; Diaz-Cruz, J. M.; Esteban, M., Multivariate curve resolution applied to the simultaneous analysis of electrochemical and spectroscopic data: Study of the Cd(II)/glutathione-fragment system by voltammetry and circular dichroism spectroscopy. *Analytica Chimica Acta* **2007**, *584*, (2), 403-409.
2. Cadmium in Drinking-water. *World Health Organization* **2004**, http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/cadmium.pdf, consulté le 2010 janvier 24.
3. Air Quality Guidelines. *WHO Regional Office for Europe* **2002**, http://www.euro.who.int/document/aiaq/6_3cadmium.pdf, consulté le 2010 janvier 24.
4. Prasad, M. N. V., Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. *Environmental and Experimental Botany* **1995**, *35*, (4), 525-545.
5. Kawakami, S. K.; Gledhill, M.; Achterberg, E. P., Determination of phytochelatins and glutathione in phytoplankton from natural waters using HPLC with fluorescence detection. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **2006**, *25*, (2), 133-142.
6. Ahner, B. A.; Kong, S.; Morel, F. M. M., Phytochelatin production in marine-algae.1. an interspecies comparison. *Limnology and Oceanography* **1995**, *40*, (4), 649-657.
7. Ahner, B. A.; Morel, F. M. M., Phytochelatin production in marine-algae.2. induction by various metals. *Limnology and Oceanography* **1995**, *40*, (4), 658-665.
8. Fojta, M.; Fojtova, M.; Havran, L.; Pivonkova, H.; Dorcak, V.; Sestakova, I., Electrochemical monitoring of phytochelatin accumulation in *Nicotiana tabacum* cells exposed to sub-cytotoxic and cytotoxic levels of cadmium. *Analytica Chimica Acta* **2006**, *558*, (1-2), 171-178.
9. Kola, H. Bio-physicochemical Parameters Influencing Cadmium Uptake by the Unicellar Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. thèse no 3601, Université de Genève Genève 2004.
10. Cobbett, C.; Goldsbrough, P., Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology* **2002**, *53*, 159-182.
11. Grill, E.; Winnacker, E. L.; Zenk, M. H., Phytochelatins - the principal heavy-metal complexing peptides of higher-plants. *Science* **1985**, *230*, (4726), 674-676.
12. Rauser, W. E., Phytochelatins. *Annual Review of Biochemistry* **1990**, *59*, 61-86.
13. Benoit, G.; Oktay, S.; Cant, A.; Hood, M. O.; Coleman, C. H.; Corapcioglu, O. and Santschi, P. H., Partitioning of Cu, Pb, Ag, Zn, Fe, Al and Mn between filter-retained particles, colloids and solution in 6 Texas estuaries. *Marine Chemistry* **1994**, *45*, (307-336).
14. Howe, G.; Merchant, S., Heavy metal-activated synthesis of peptides in *Chlamydomonas-reinhardtii*. *Plant Physiology* **1992**, *98*, (1), 127-136.

15. Ahner, B. A.; Price, N. M.; Morel, F. M. M., Phytochelatin production by marine-phytoplankton at low free metal-ion concentrations-laboratory studies and field data from Massachusetts Bay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1994**, *91*, (18), 8433-8436.
16. Le Faucheur, S. B., Renata; Sigg, Laura, Thiol and Metal Contents in Periphyton Exposed to Elevated Copper and Zinc Concentrations: A Field and Microcosm Study. *Environmental Science and Technology* **2005**, *39*, (20), 8099-8107.
17. Le Faucheur, S. B., Renata; Sigg, Laura, Phytochelatin induction, cadmium accumulation, and algal sensitivity to free cadmium ion in *Scenedesmus vacuolatus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2005**, *24*, (7), 1731-1737.
18. Grill, E.; Winnacker, E. L.; Zenk, M. H., Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1987**, *84*, (2), 439-443.
19. Perales-Vela, H. V.; Pena-Castro, J. M.; Canizares-Villanueva, R. O., Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere* **2006**, *64*, (1), 1-10.
20. Le Faucheur, S. S., Fabian; Behra, Renata; Sigg, Laura, Thiols in *Scenedesmus vacuolatus* upon exposure to metals and metalloids *Aquatic Toxicology* **2006**, *80*, (4), 355-361.
21. Mehra, R. K.; Tarbet, E. B.; Gray, W. R.; Winge, D. R., Metal specific synthesis of 2 metallothioneins and gamma-glutamyl-transferase peptides in *Candida glabrata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1988**, *85*, (23), 8815-8819.
22. Rauser, W. E., Structure and function of metal chelators produced by plants - The case for organic acids, amino acids, phytin, and metallothioneins. *Cell Biochemistry and Biophysics* **1999**, *31*, (1), 19-48.
23. Grill, E.; Löffler, S.; Winnacker, E. L.; Zenk, M. H., Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific gamma-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1989**, *86*, (18), 6838-6842.
24. Rauser, W. E., Phytochelatins and related peptides -structure, biosynthesis, and function. *Plant Physiology* **1995**, *109*, (4), 1141-1149.
25. Vatamaniuk, O. K.; Mari, S.; Lang, A.; Chalasani, S.; Demkiv, L. O.; Rea, P. A., Phytochelatin synthase, a dipeptidyltransferase that undergoes multisite acylation with gamma-glutamylcysteine during catalysis - Stoichiometric and site-directed mutagenic analysis of *Arabidopsis thaliana* PCS1-catalyzed phytochelatin synthesis. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, (21), 22449-22460.
26. Strasdeit, H.; Duhme, A. K.; Kneer, R.; Zenk, M. H.; Hermes, C.; Nolting, H. F., Evidence for discrete Cd(SCYS)₄ units in cadmium phytochelatin complexes from EXAFS spectroscopy. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* **1991**, (16), 1129-1130.
27. Bramanti, E.; Toncelli, D.; Morelli, E.; Lampugnani, L.; Zamboni, R.; Miller, K. E.; Zemetra, J.; D'Ulivo, A., Determination and characterization of phytochelatins by liquid chromatography coupled with on line chemical vapour generation and atomic fluorescence spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1133*, (1-2), 195-203.
28. Wang, H. O.; Shan, X. Q.; Zhang, S. Z.; Wen, B., Preliminary characterization of a light-rare-earth-element-binding peptide of a natural perennial fern *Dicranopteris dichotoma*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2003**, *376*, (1), 49-52.

29. Scarano, G.; Morelli, E., Properties of phytochelatin-coated CdS nanocrystallites formed in a marine phytoplanktonic alga (*Phaeodactylum tricornutum*, Bohlin) in response to Cd. *Plant Science* **2003**, *165*, (4), 803-810.
30. Polec-Pawlak, K.; Ruzik, R.; Lipiec, E., Investigation of Cd(II), Pb(II) and Cu(I) complexation by glutathione and its component amino acids by ESI-MS and size exclusion chromatography coupled to ICP-MS and ESI-MS. *Talanta* **2007**, *72*, (4), 1564-1572.
31. Knauer, K.; Ahner, B.; Xue, H. B.; Sigg, L., Metal and phytochelatin content in phytoplankton from freshwater lakes with different metal concentrations. *Environmental Toxicology and Chemistry* **1998**, *17*, (12), 2444-2452.
32. Ferrat, L.; Pergent-Martini, C.; Romeo, M., Assessment of the use of biomarkers in aquatic plants for the evaluation of environmental quality: application to seagrasses. *Aquatic Toxicology* **2003**, *65*, (2), 187-204.
33. Keltjens, W. G.; van Beusichem, M. L., Phytochelatins as biomarkers for heavy metal stress in maize (*Zea mays* L) and wheat (*Triticum aestivum* L): Combined effects of copper and cadmium. *Plant and Soil* **1998**, *203*, (1), 119-126.
34. Keltjens, W. G.; van Beusichem, M. L., Phytochelatins as biomarkers for heavy metal toxicity in maize: Single metal effects of copper and cadmium. *Journal of Plant Nutrition* **1998**, *21*, (4), 635-648.
35. Ahner, B. A.; Lee, J. G.; Price, N. M.; Morel, F. M. M., Phytochelatin concentrations in the equatorial Pacific. *Deep-Sea Research Part I-Oceanographic Research Papers* **1998**, *45*, (11), 1779-1796.
36. Ahner, B. A.; Morel, F. M. M.; Moffett, J. W., Trace metal control of phytochelatin production in coastal waters. *Limnology and Oceanography* **1997**, *42*, (3), 601-608.
37. Wei, L. P.; Donat, J. R.; Fones, G.; Ahner, B. A., Interactions between Cd, and Cu, and Zn influence particulate phytochelatin concentrations in marine phytoplankton: Laboratory results and preliminary field data. *Environmental Science & Technology* **2003**, *37*, (16), 3609-3618.
38. Morelli, E.; Fantozzi, L., Phytochelatins in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* bohlin: An evaluation of their use as biomarkers of metal exposure in marine waters. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **2008**, *81*, (3), 236-241.
39. Fan, T. W. M.; Lane, A. N.; Higashi, R. M., An electrophoretic profiling method for thiol-rich phytochelatins and metallothioneins. *Phytochemical Analysis* **2004**, *15*, (3), 175-183.
40. Chekmeneva, E.; Prohens, R.; Daaz-Cruz, J. M.; Arino, C.; Esteban, M., Thermodynamics of Cd²⁺ and Zn²⁺ binding by the phytochelatin (gamma-Glu-Cys)(4)-Gly and its precursor glutathione. *Analytical Biochemistry* **2008**, *375*, (1), 82-89.
41. Wei, Z. G.; Wong, J. W. C.; Chen, D. Y., Speciation of heavy metal binding non-protein thiols in *Agropyron elongatum* by size-exclusion HPLC-ICP-MS. *Microchemical Journal* **2003**, *74*, (3), 207-213.
42. Sestakova, I.; Mader, P., Voltammetry on mercury and carbon electrodes as a tool for studies of metallothionein interactions with metal ions. *Cellular and Molecular Biology* **2000**, *46*, (2), 257-267.
43. Yosypchuk, B.; Sestakova, I.; Novotny, L., Voltammetric determination of phytochelatins using copper solid amalgam electrode. *Talanta* **2003**, *59*, (6), 1253-1258.
44. Alberich, A.; Arino, C.; Diaz-Cruz, J. M.; Esteban, M., Soft modelling for the resolution of highly overlapped voltammetric peaks: application to some Pb-phytochelatin systems. *Talanta* **2007**, *71*, (1), 344-352.

45. Cao, X. D.; Zhao, G. W.; Yin, M.; Li, J. X., Determination of ultratrace rare earth elements in tea by inductively coupled plasma mass spectrometry with microwave digestion and AG50W-x8 cation exchange chromatography. *Analyst* **1998**, *123*, (5), 1115-1119.
46. Szpunar, J.; Chassaigne, H.; Makarov, A.; Lobinski, R., Limitations of high performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric detection for speciation analysis of trace metals in biological samples. *Chemia Analityczna* **1999**, *44*, (3), 351-362.
47. Szpunar, J., Bio-inorganic speciation analysis by hyphenated techniques. *Analyst* **2000**, *125*, (5), 963-988.
48. Szpunar, J.; McSheehy, S.; Polec, K.; Vacchina, V.; Mounicou, S.; Rodriguez, I.; Lobinski, R., Gas and liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry detection for environmental speciation analysis - advances and limitations. **2000**, 779-793.
49. Leopold, I.; Gunter, D.; Neumann, D., Application of high performance liquid chromatography - inductively coupled plasma mass spectrometry to the investigation of phytochelatin complexes and their role in heavy metal detoxification in plants. *Analysis* **1998**, *26*, (6), M28-M32.
50. Vacchina, V.; Polec, K.; Szpunar, J., Speciation of cadmium in plant tissues by size-exclusion chromatography with ICP-MS detection. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **1999**, *14*, (10), 1557-1566.
51. Bluemlein, K.; Raab, A.; Feldmann, J., Stability of arsenic peptides in plant extracts: off-line versus on-line parallel elemental and molecular mass spectrometric detection for liquid chromatographic separation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2009**, *393*, (1), 357-366.
52. Lobinski, R. S.; Szpunar, J., Biochemical speciation analysis by hyphenated techniques. **1999**, 321-332.
53. Lobinski, R. S.; Pereiro, I. R.; Chassaigne, H.; Wasik, A.; Szpunar, J., Elemental speciation and coupled techniques - towards faster and reliable analyses - Plenary Lecture. **1998**, 859-867.
54. Vacchina, V.; Chassaigne, H.; Oven, M.; Zenk, M. H.; Lobinski, R., Characterisation and determination of phytochelatins in plant extracts by electrospray tandem mass spectrometry. *Analyst* **1999**, *124*, (10), 1425-1430.
55. Chassaigne, H.; Lobinski, R., Characterization of metallothionein isoforms by reversed-phase high-performance liquid chromatography with on-line post-column acidification and electrospray mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* **1998**, *829*, (1-2), 127-136.
56. Yen, T. Y.; Villa, J. A.; DeWitt, J. G., Analysis of phytochelatin-cadmium complexes from plant tissue culture using nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry and capillary liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **1999**, *34*, (9), 930-941.
57. Mounicou, S.; Vacchina, V.; Szpunar, J.; Potin-Gautier, M.; Lobinski, R., Determination of phytochelatins by capillary zone electrophoresis with electrospray tandem mass spectrometry detection (CZE-ES MS/MS). *Analyst* **2001**, *126*, (5), 624-632.
58. El-Zohri, M. H. A.; Cabala, R.; Frank, H., Quantification of phytochelatins in plants by reversed-phase HPLC-ESI-MS-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2005**, *382*, (8), 1871-1876.

59. Perez-Rama, M.; Vaamonde, E. T.; Alonso, J. A., Capillary zone electrophoresis for analysis of phytochelatins and other thiol peptides in complex biological samples derivatized with monobromobimane. *Electrophoresis* **2005**, 26, (3), 610-620.
60. Zhang, W. H.; Cai, Y., Purification and characterization of thiols in an arsenic hyperaccumulator under arsenic exposure. *Analytical Chemistry* **2003**, 75, (24), 7030-7035.
61. Thibault, P., Spectrométrie de masse. *Note de cours CHM 3102, Université de Montréal* **2009**, 23.
62. CEAEQ, *Protocole pour la validation d'une méthode d'analyse en chimie*. Bibliothèque et Archives nationales du Québec: Québec, Canada, 2007; p 1-29.
63. Eurachem, The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. *United Kingdom* **1998**, 75.
64. C.E.A.E.Q, Protocole pour la validation d'une méthode d'analyse en chimie *Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec* **2007**, Québec, Canada, 30.
65. Pelchat, J., L'induction de phytochélatines (PC) chez *Chlamydomonas reinhardtii* suite à son exposition à la nanoparticule quantique CdTe. . *Rapport de stage, Université de Montréal* **2008**, 6.
66. Hassler, C. S., Slaveykova, V.I. and K.J. Wilkinson, Discriminating between intra- and extracellular metals using chemical extractions. *Limnology and Oceanography, methods* **2004**, 2, 237-247.
67. Varian, User guide for graphite tube atomiser AA240Z/GTA120. **2005**, 42.
68. Morelli, E.; Scarano, G., Synthesis and stability of phytochelatins induced by cadmium and lead in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Marine Environmental Research* **2001**, 52, (4), 383-395.
69. Davis, T. A., SUBS- Stirred Underwater Biouptake System : A new in-situ tool for the exposure and analysis of microorganisms in natural aquatic systems. *submit to enviro. Science tech* **2009**.
70. Product speciations Finnigan TSQ Quantum Ultra AMTM. *Thermo Fisher Scientific inc.* **2007**, consulté le 2008 septembre 24.
71. Phytochelatin. *Anaspec inc.* **2008**, <http://search.anaspec.com/?keywords=phytochelatin>, consulté le 2008 septembre 24.
72. Phenomenex, *Chromatography product guide*. USA, 2009; p 122.
73. Harris, D. C., *Quantitative Chemical Analysis*. W.H. Freeman and Company: New York, 1999; p 74.
74. Slaveykova, V. I.; Wilkinson, K. J., Predicting the bioavailability of metals and metal complexes: Critical review of the biotic ligand model. *Environmental chemistry* **2005**, 2, 9-24.
75. Harris, E., *The Chlamydomonas Sourcebook*. *Academic Press* **1989**, 2000

Table 1 Conditions used for the separation and detection of phytochelatin

HPLC			MS		
Column	Eclipse XDB-C18		Ionization	ESI	
Flow rate	500 $\mu\text{L min}^{-1}$		Analyzer	Triple quadrupole	
Injected volume	3 μL		Mode	SRM	Positive
Mobile phase	A : H ₂ O, 0.1% formic acid			Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)
	B : Acetonitrile, 0.1% formic acid				336.100
Gradient	Minutes	Solvent A		540.200	411.200
	0.00-10.00	95.0 %			336.100
	10.00-11.00	50.0 %		772.200	465.100
	11.00-13.00	10.0 %			540.100
	13.00-13.10	10.0 %		1004.300	697.100
	13.10-18.00	95.0 %			
			Mode	Full scan (m/z) 100.000-1100.000	

Table 2 Instrumental detection limit and instrumental quantification limit for phytochelatin analysis following HPLC-ESI-MS/MS determination.

Phytochelatin	Instrumental detection limit	Instrumental quantification limit
PC2	12 $\mu\text{g L}^{-1}$	27 $\mu\text{g L}^{-1}$
PC3	31 $\mu\text{g L}^{-1}$	69 $\mu\text{g L}^{-1}$
PC4	85 $\mu\text{g L}^{-1}$	196 $\mu\text{g L}^{-1}$

Table 3. Slopes and the determination coefficients for phytochelatin standards homogenate in 25 mM DTT with or without algal matrix.

Analyte Matrix		PC2		PC3		PC4	
		Without	With	Without	With	Without	With
Day 1	Slope	4167	2388	407	242	27	23
	R ²	0.997	0.907	0.997	0.958	0.988	0.945
Day 2	Slope	2439	1180	222	132	15	11
	R ²	0.995	0.738	0.998	0.864	0.961	0.942
Day 3	Slope	2394	1156	196	117	13	13
	R ²	0.995	0.923	0.991	0.979	0.994	0.955

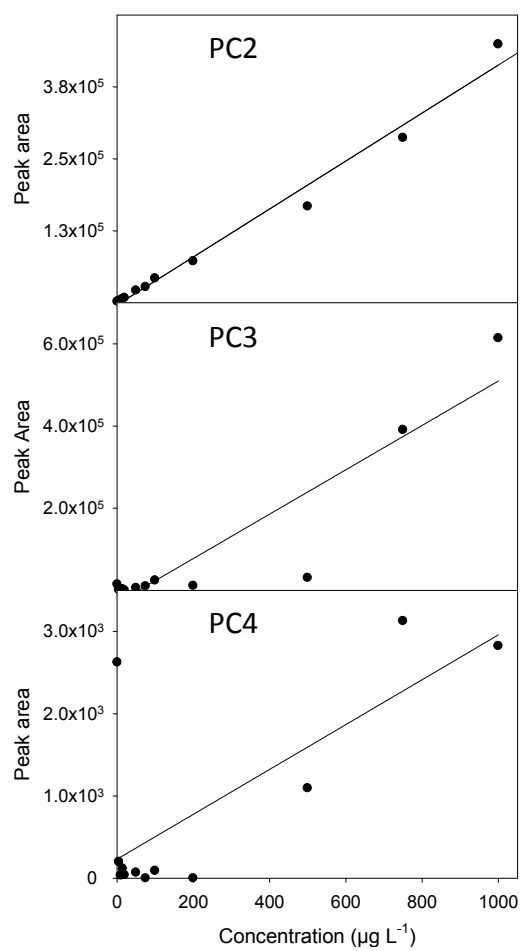


Fig. 1. Peak areas determined from HPLC-ESI-MS/MS analysis of 3 phytochelatin standards (PC2, PC3, PC4) prepared in water.

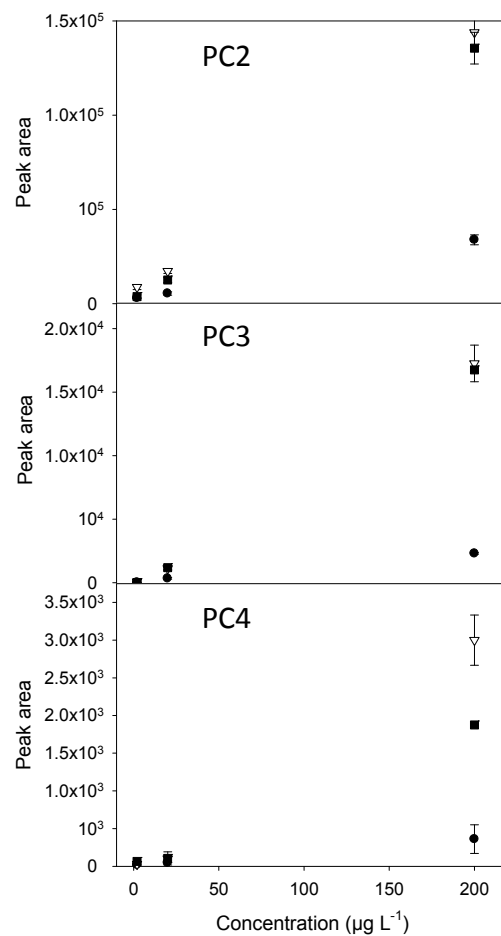


Fig. 2 Effect of the reducing agent on surface areas for different concentrations of the phytochelatins: 0 mM DTT (black circle), 25 mM DTT (white triangle) and 50 mM DTT (black square).

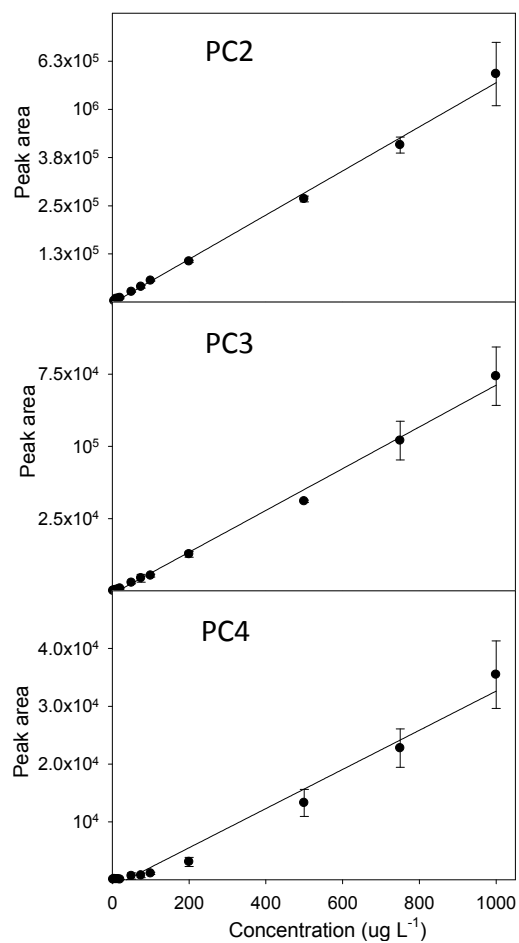


Fig. 3 Linearity domain for the three phytochelatins determined from HPLC-ESI-MS/MS analysis of PC standards in a reducing homogenate (25 mM DTT).

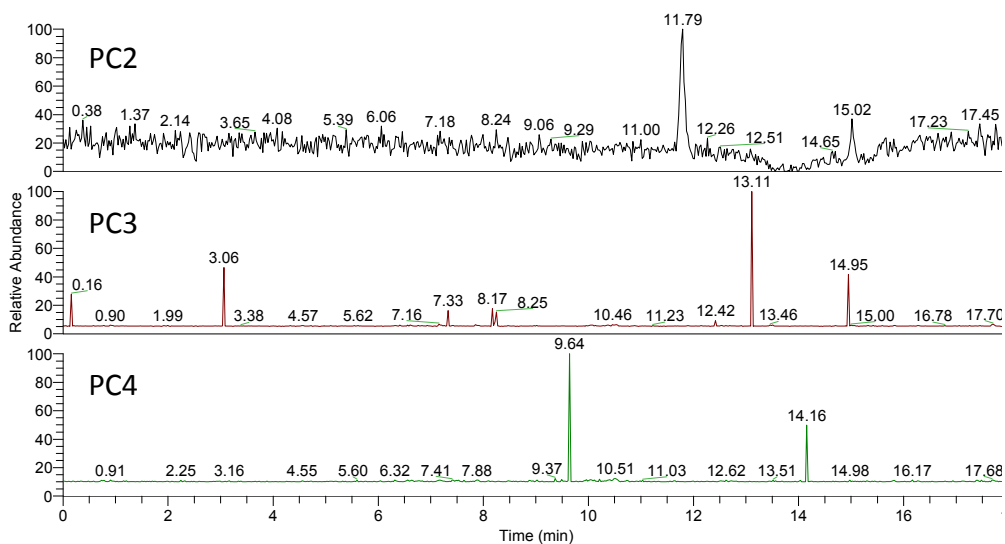


Fig. 4 HPLC-ESI-MS/MS analysis of the algal homogenate (matrix).

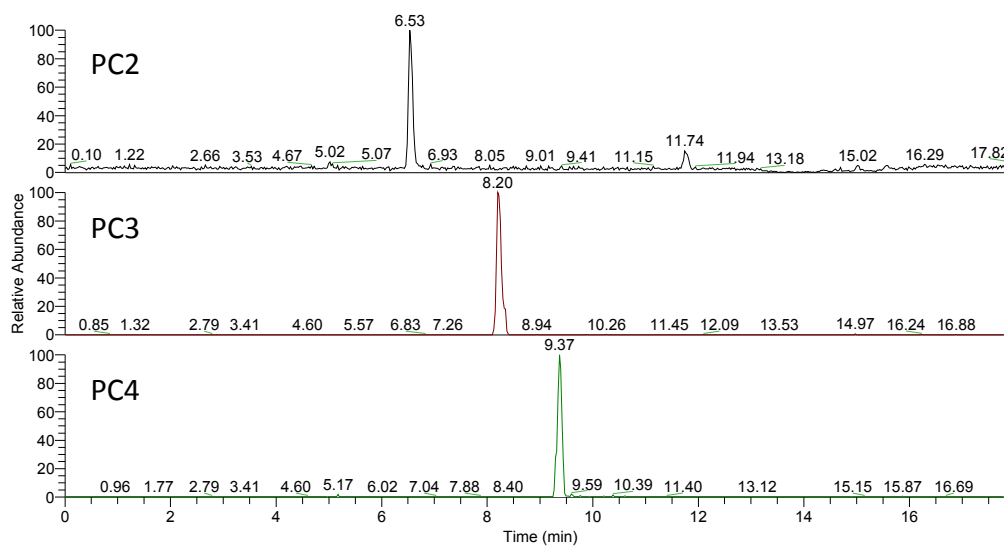


Fig. 5 HPLC-ESI-MS/MS analysis of $500 \mu\text{g L}^{-1}$ of the phytochelatin standards spiked into the algal homogenates (matrix).

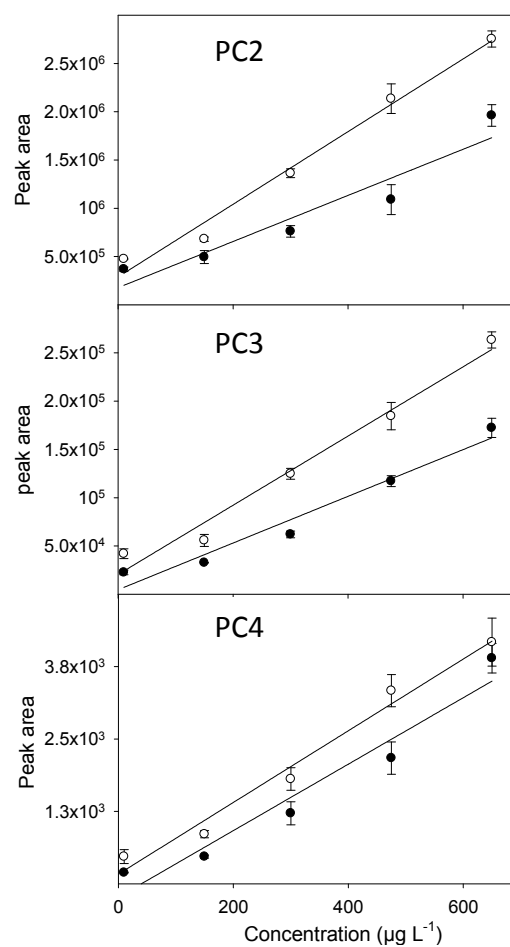


Fig. 6. Linearity of the HPLC-ESI-MS/MS analysis of phytochelatin standards in 25 mM DTT with (black circle) or without (white circle) algal matrix.

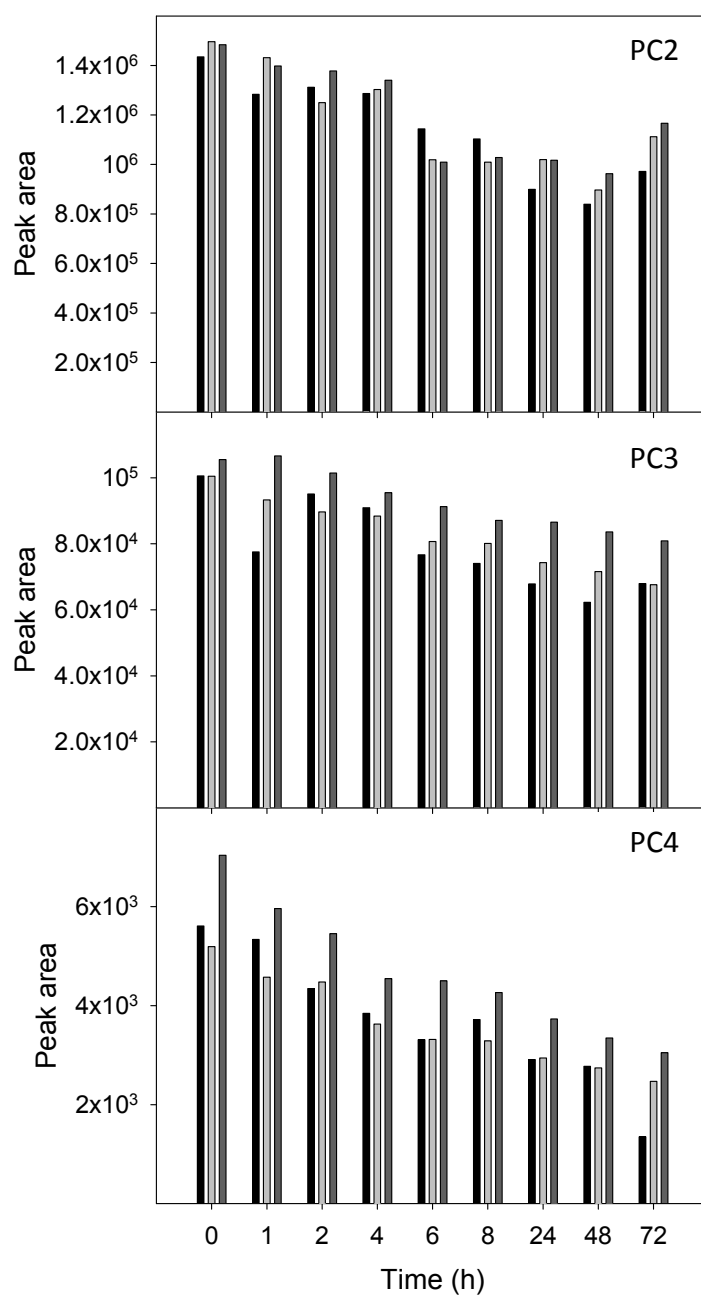


Fig. 7. Stability of the phytochelatins according to their storage condition, -20 °C (black), 1 °C (light grey) and room temperature (dark grey).

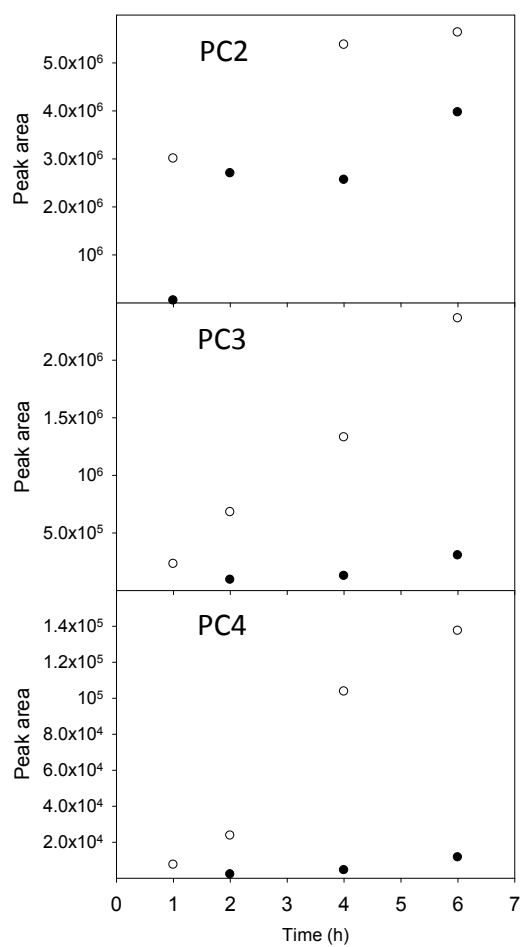


Fig. 8 Analysis of phytochelatins induced by *C. reinhardtii* that were exposed to 10^{-7} M Cd (black circle, 10^{-8} M Cd²⁺) and 10^{-6} M Cd (white circle, 10^{-7} M Cd²⁺).

